

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-508184

(P2002-508184A)

(43) 公表日 平成14年3月19日 (2002.3.19)

(51) Int.Cl.⁷

C 1 2 N 15/09

識別記号

Z N A

F I

C 1 2 N 15/00

テマコード* (参考)

Z N A A 4 B 0 2 4

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 69 頁)

(21) 出願番号 特願2000-539150(P2000-539150)
(86) (22) 出願日 平成10年12月11日 (1998.12.11)
(85) 翻訳文提出日 平成12年6月12日 (2000.6.12)
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 8 / 2 5 7 1 9
(87) 国際公開番号 W O 9 9 / 3 1 2 5 1
(87) 国際公開日 平成11年6月24日 (1999.6.24)
(31) 優先権主張番号 0 8 / 9 8 9 , 3 9 4
(32) 優先日 平成9年12月12日 (1997.12.12)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 セル ジェネシス, インコーポレイティド
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94404,
フォスター シティ, レイクサイド ドラ
イブ 342
(72) 発明者 ナルディニ, ルイジ
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94404,
フォスター シティ, レイクサイド ドラ
イブ 342, セル ジェネシス, インコー
ポレイティド
(74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高力価で安全な組換えレンチウイルスベクター作成の方法及び手段

(57) 【要約】

5側LTR又は5'及び3'側LTRの両方で修飾され
たレンチウイルスベクターは、組換えレンチウイルスベ
クターの作製に有用である。このようなベクターは、機
能性tat遺伝子の不存在下で作製することができる。
この導入遺伝子を保持するベクターによる宿主細胞の複
数の形質転換は、ウイルス産生を増強する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 各々がU3領域を有する5'側LTR及び3'側LTRを含むレンチウイルス導入ベクターであり、ここで5'側LTRのU3領域の調節エレメントの一部又は全てが、該レンチウイルスに対して内因性でなく、哺乳類細胞において操作できるように、他の調節エレメントによって置換されている、レンチウイルス導入ベクター。

【請求項2】 前記3'側LTRのU3領域の1個以上のヌクレオチド塩基が欠失されている、請求項1記載の導入ベクター。

【請求項3】 前記レンチウイルスに対して内因性でない調節エレメントが、サイトメガロウイルスのエンハンサー、プロモーター又はエンハンサー／プロモーターである、請求項1記載のベクター。

【請求項4】 前記レンチウイルスに対して内因性でない調節エレメントが、ラウス肉腫ウイルスのエンハンサー、プロモーター又はエンハンサー／プロモーターである、請求項1記載のベクター。

【請求項5】 前記欠失されたU3領域が、5'末端ジヌクレオチド及びatt配列以外の該U3領域の全てである、請求項2記載のベクター。

【請求項6】 前記欠失したU3領域が、TATAボックス配列を含む、請求項5記載のベクター。

【請求項7】 前記ベクターが発現された異種遺伝子を保持する、請求項1記載のベクター。

【請求項8】 前記レンチウイルスがヒト免疫不全ウイルス(HIV)である、請求項1記載のベクター。

【請求項9】 前記HIVがHIV-1である、請求項8記載のベクター。

【請求項10】 該レンチウイルスに対し内因性であるgagの上流の配列を欠失し、かつ該レンチウイルスに対し内因性であるenvの下流の配列を欠失している、レンチウイルスパッケージングプラスミド。

【請求項11】 前記プラスミドが発現されたgag遺伝子、発現されたpol遺伝子又は発現されたgag及びpol遺伝子を保持する、請求項10記載のパッケージングプラスミド。

【請求項12】 前記プラスミドが非機能性tat遺伝子を保持する、請求項10記載のパッケージングプラスミド。

【請求項13】 前記レンチウイルスがヒト免疫不全ウイルス(HIV)である、請求項10記載のパッケージングプラスミド。

【請求項14】 前記HIVがHIV-1である、請求項13記載のパッケージングプラスミド。

【請求項15】 下記工程を含む、組換えレンチウイルスベクターの製造法：

a) i) 該レンチウイルスに対し内因性であるgagの上流の配列を欠失し、かつ該レンチウイルスに対し内因性であるenvの下流の配列を欠失している、少なくとも1種のレンチウイルスパッケージングプラスミドであり、かつこれが発現されたgag遺伝子、発現されたpol遺伝子又は発現されたgag及びpol遺伝子を保持する少なくとも1種のパッケージングプラスミドであるもの；及び

ii) 該レンチウイルスに対して内因性でない発現されたenv遺伝子を保持する該レンチウイルスに対し内因性でない発現プラスミド；

により細胞を形質転換し、パッケージング細胞を得る工程；

b) 前記パッケージング細胞を、発現された異種遺伝子を保持するレンチウイルス導入ベクターにより複数の形質転換を行い、プロデューサー細胞を得る工程；

c) 前記プロデューサー細胞を培地において培養する工程；及び

d) 前記プロデューサー細胞を該培地から分離し、該組換えレンチウイルスベクターを該培地から回収する工程。

【請求項16】 前記パッケージング細胞が非機能性tat遺伝子を保持する、請求項15記載の方法。

【請求項17】 前記レンチウイルス導入ベクターが、各々がU3領域を有する5'側LTR及び3'側LTRを含み、ここで5'側LTRのU3領域の調節エレメントの一部又は全てが、該レンチウイルスに対して内因性でなく、哺乳類細胞において操作できるように、他の調節エレメントによって置換されている、請求項15記載の方法。

【請求項18】 前記3'側LTRのU3領域の1個以上のヌクレオチド塩基が欠失されている、請求項17記載の方法。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、新規レンチウイルスパッケージングベクター、問題の外来遺伝子を保持する導入ベクター、安定したパッケージング細胞株、安定したプロデューサー細胞株、及び哺乳類細胞中で組換えレンチウイルスを産生するためのそれらの使用に関する。

発明の背景

レトロウイルスベクターは、遺伝子送達のための一般的道具である (Miller, Nature, 357: 455-460 (1992))。レトロウイルスベクターの再編成されない単一コピー遺伝子を広い範囲の齧歯類、霊長類及びヒトの体細胞にと送達する能力は、細胞への遺伝子導入に良く適したレトロウイルスベクターを作出する。

組換えレトロウイルスベクターを作製するために有用な付属物は、感染性ビリオンの作製に必要なタンパク質をトランス (in trans) で供給するパッケージング細胞株であるが、このような細胞は、内因性のウイルスゲノム核酸をパッケージングすることが不可能である (Watanabe及びTemin, Molec. Cell Biol., 3 (12): 2241-2249 (1983); Mannら, Cell, 33: 153-159 (1983); Embretson及びTemin, J. Virol., 61 (9): 2675-2683 (1987))。レトロウイルスパッケージング細胞株の構築に関する考察は、齧歯類 (Cloydら, J. Exp. Med., 151: 542-552 (1980)) 及び霊長類 (Donahueら, J. Exp. Med., 176: 1125-1135 (1992)) においてTリンパ球を産生することが示されている、組換えの複製コンピテントのレトロウイルス (RCR) を含まない高力価のベクターの上清の作製である。

パッケージング細胞においてRCRの生成の可能性を最小にするひとつの方法は、パッケージング機能を2個のゲノム、例えば、一方はgag及びpol遺伝子産物を発現し、他方はenv遺伝子産物を発現するものに分割することである (Bosselmanら, Molec. Cell Biol., 7 (5) 179

7-1806 (1987) ; Markowitzら、J. Virol.、62 (4) : 1120-1124 (1988) ; Danos及びMulligan. Proc. Natl. Acad. Sci.、85 : 6460-6464 (1988)))。この方法は、これらの2個のゲノムの同時パッケージング及びそれに続く導入の能力、更にはRCRを産生するための該パッケージング細胞における3個のレトロウイルスゲノムの存在に起因した組換え頻度を顕著に減少する能力を最小化する。

組換え体が生じる事象において、いずれか可能性のある組換え体を機能しなくするために望ましくない遺伝子産物内に変異 (Danos及びMulligan、前記) 又は欠失 (Boselmanら、前記 ; Markowitzら、前記) を設計することができる。加えて、両パッケージング構築物上の3' 側LTRの欠失は、機能的組換え体を形成する能力も低下させる。

レンチウイルスは、一般的なレトロウイルス遺伝子gag、pol及びenvに加えて、調節又は構造機能を伴う他の遺伝子を含む複合レトロウイルスである。高度な複雑性は、潜伏感染期に、レンチウイルスがその生活環を変調することを可能にする。

典型的レンチウイルスは、AIDSの病原物質であるヒト免疫不全ウイルス (HIV) である。In vivoにおいてHIVは、リンパ球及びマクロファージのような分裂が稀である最終的に分化した細胞に感染することができる。In vitroにおいて、HIVは、単球由来マクロファージ (MDM) の初代培養、更にはアフィディコリン又はγ線照射の処理によって細胞周期が抑制されたHeLa-Cd4細胞又はTリンパ球細胞に感染することができる。

細胞の感染は、標的細胞の核膜孔を通じてのHIVの組込み前複合体の核への能動輸送に左右される。これは、標的細胞の核への輸送機構と、該複合体中の複数の部分的に多重複の分子決定基の相互作用によって生じる。同定された決定基は、gagマトリックス (MA) タンパク質、親核性の (Karyophilic) ビリオン-関連タンパク質、vpr、及びgag MAタンパク質のC-末端ホスホチロシン残基の機能的核局在化シグナル (NLS) を含む。

発明の概要

従って、本発明は、パッケージできるレンチウイルスベクター転写物及び哺乳類細胞における高力価組換えレンチウイルスの迅速な作製のためのレンチウイルスタンパク質の両方の合成に関係する新規の安全化されたレンチウイルスベクターに関する。これらの結果は、問題の外来遺伝子を標的細胞へ送達するための感染性粒子である。本発明は更に、ウイルス産生のための細胞株を提供する。

発明の詳細な説明

本発明は、非分裂細胞を感染することが可能な組換えレンチウイルス、更にはこれを製造する方法及び手段を提供する。このウイルスは、核酸配列の *in vivo* 及び *ex vivo* における導入及び発現に有用である。

レンチウイルスゲノム及びプロウイルスDNAは、レトロウイルスにおいて発見された3個の遺伝子を有する：*gag*、*pol* 及び *env* であり、これらには、2個の長い末端反復配列 (LTR) が隣接している。*gag* 遺伝子は、内部構造 (マトリックス、キャプシド及びヌクレオキャプシド) タンパク質をコードし；*pol* 遺伝子は、RNA-依存性DNAポリメラーゼ (逆転写酵素)、プロテアーゼ及びインテグラーゼをコードし；並びに、*env* 遺伝子は、ウイルスのエンベロープの糖タンパク質をコードしている。5' 及び3' 側LTRは、ビリオンRNAの転写及びポリアダニル化を促進するのに利用できる。LTRは、ウイルス複製に必要な他のシス作用性配列を全て含む。レンチウイルスは、*vif*、*vpr*、*tat*、*rev*、*vpu*、*nef* 及び *vpx* (HIV-1、HIV-2 及び/又はSIV) を含む追加遺伝子を有する。

5' 側LTRへの隣接物は、ゲノムの逆転写に必要な配列 (tRNAプライマー結合部位) 及びウイルスRNAの粒子への効果的なキャプシド形成に必要な配列 (プサイ部位) である。キャプシド形成 (又はレトロウイルスRNAの感染ビリオンへのパッケージング) に必要な配列がウイルスゲノムから失われた場合は、このシス欠損は、ゲノムRNAのキャプシド形成を妨げる。しかし、得られる変異体は、依然全てのビリオンタンパク質の合成を指向することが可能である。

本発明は、パッケージング機能、すなわち *gag*、*pol* 及び *env*、更には *rev* 及び *tat* を有する2種以上のベクターにより適当な宿主細胞へトランスフェクションすることを含む、非分裂細胞を感染することが可能な組換えレンチ

ウイルスを作製する方法を提供する。以下に説明するように、機能性 *tat* 遺伝子を欠いているベクターが、特定の用途のためには望ましい。従って、パッケージング細胞を産生するために、例えば第一のベクターは、ウイルス性 *gag* 及びウイルス性 *pol* をコードしている核酸を提供することができ、かつ別のベクターは、ウイルス性 *env* をコードしている核酸を提供することができる。本願明細書において導入ベクターと同定される異種遺伝子を提供するベクターのパッケージング細胞への組入れは、問題の外来遺伝子を保持する感染性ウイルス粒子を放出するプロデューサー細胞を生じる。

前述のベクターそれ自体は、本願明細書において開示された新規に構築されたベクターの範囲外であるが、これは当該技術分野において公知であり、Naldi *et al.* の論文 (Sci., 272: 263-267 (1996)); 及び Zufferey *et al.* の論文 (Nat. Biotech., 15: 871-875 (1997)) を参照のこと。一般にこれらのベクターは、プラスミドをベースにした又はウイルスをベースにしたものであり、外来核酸の組入れ、核酸の選択及び宿主細胞への導入に必須の配列を保持するように設計されている。問題のベクターの *gag*、*pol* 及び *env* 遺伝子も、当該技術分野において公知である。従って関連する遺伝子が、選択されたベクターにクローニングされ、その後問題の標的細胞の形質転換に使用される。

前述のベクター及び外来遺伝子の設計に従い、第二のベクターは、ウイルス性エンベロープ (*env*) 遺伝子をコードしている核酸を提供することができる。*env* 遺伝子は、レトロウイルスを含むあらゆるウイルスに由来することができる。好ましくは *env* は、ヒト及び他種の細胞の形質導入を可能にする両種指向性エンベロープタンパク質である。

このエンベロープタンパク質の抗体との結合、又は特定の細胞種のレセプターへの標的化のための特定のリガンドにより組換えウイルスを標的化することが望ましい。ウイルスベクターに問題の配列 (調節領域を含む) を、例えば特異的標的細胞上の受容体のリガンドをコードしている他の遺伝子と共に挿入することにより、このベクターは標的特異性となる。レトロウイルスベクターは、例えば糖脂質又はタンパク質の挿入により、標的特異性に作製することができる。標的化

は、抗体又は組換え抗体型分子、例えば1本鎖抗体などの抗原-結合部分を使用することにより達成され、レトロウイルスベクターを標的化する事が多い。当業者には、特異的標的へのレトロウイルスベクターの送達を達成する具体的な方法は公知であるか、又は過度の実験をすることなく容易に確かめるであろう。

レトロウイルス由来のenv遺伝子の例は、モロニー Maus 白血病ウイルス (MoMuLV又はMMLV)、ハーベイ Maus 肉腫ウイルス (HaMuSV又はHSV)、マウス乳がんウイルス (MuMTV又はMMTV)、ギボンサル白血病ウイルス (GaLV又はGALV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 及びラウス肉腫ウイルス (RSV) を含むが、これらに限定されるものではない。水泡性口内炎ウイルス (VSV) プロテインG (VSVG)、肝炎ウイルス及びインフルエンザのそのような他のenv遺伝子も使用することができる。

ウイルス性env核酸配列を提供するベクターは、例えばプロモーター又はエンハンサーのような調節配列に機能的に結合している。この調節配列は、真核生物のプロモーターまたはエンハンサーであることができ、例えばモロニー Maus 白血病ウイルスのプロモーター-エンハンサーエレメント、ヒトサイトメガロウイルスのエンハンサー又はワクシニア P7.5 のプロモーターを含む。一部の場合は、モロニー Maus 白血病ウイルスのプロモーター-エンハンサーエレメントのように、プロモーター-エンハンサーエレメントが、LTR配列内に又はこれに隣接して位置する。

好ましくはこの調節配列は、ベクターが構築されたレンチウイルスにとって内因性でないものである。従って、ベクターがSIVから作出された場合は、SIV LTRに認められるSIV調節配列は、SIVを起源としない調節エレメントによって置き換えられるであろう。

VSVGは組換えウイルスに広範な宿主細胞の範囲を付与するので、VSVGタンパク質は望ましいenv遺伝子であるが、VSVGは宿主細胞にとって有害であり得る。従って、VSVGに関する遺伝子のような遺伝子を使用される場合は、誘導性プロモーターシステムを使用し、その結果VSVG発現が必要でない場合には、VSVG発現を宿主毒性が最小になるように調節できるようにすることが好ましい。

例えばGossen及びBujardの論文(Proc. Natl. Acad. Sci., 89:5547-5551(1992))に記載されたテトラサイクリン-調節性遺伝子発現システムを用いて、テトラサイクリンが導入された細胞から取り除かれた場合にVSV Gの誘導発現を提供するために利用することができる。従って、tet/VP16トランスアクチベーターは、第一のベクター上に存在し、かつVSV Gをコードする配列は、別のベクター上のtetオペレーター配列によって制御されたプロモーターの下流にクローニングされる。

異種又は外来の核酸配列である導入遺伝子は、調節核酸配列に操作できるように連結される。本願明細書において使用される用語「異種」核酸配列は、外来種を起源とする配列、又は同種に由来する場合にはこれが当初の形から実質的に修飾されていることを意味する。あるいは、細胞では通常は発現しない未変化の核酸配列は、異種核酸配列である。

用語「操作できるように連結」とは、調節配列と異種核酸配列が機能的に連結し、後者の発現を生じることを意味する。好ましくは、異種配列は、プロモーターに連結され、キメラ遺伝子を生じる。この異種核酸配列は、好ましくはウイルス性LTRプロモーター-エンハンサーシグナル又は内部プロモーターのいずれかの制御下にあり、レトロウイルスLTR内に保持されたシグナルは、依然導入遺伝子の効果的発現をもたらすことができる。

前記外来遺伝子は、転写することができる問題の核酸のいずれかであることができる。一般に外来遺伝子はポリペプチドをコードしている。このポリペプチドは、何らかの治療上の利点があるものが好ましい。ポリペプチドは、宿主細胞において、内因性タンパク質の発現の欠損又は不存在を補うことができる。このポリペプチドは、宿主細胞に新たな特性、例えば米国特許第5,359,046号に開示されたキメラシグナル受容体などを与えることができる。技術者は、本願明細書に記載しかつ当該技術分野において公知である技術を実践し外来遺伝子の適性を決定することができる。例えば技術者は、外来遺伝子はキャプシド形成に適した大きさかどうか、及び外来遺伝子産物が適切に発現されるかどうかということを知っているであろう。

本発明の方法による分子の組入れにより細胞において分子を調節する遺伝子の

発現を変調することが望ましい。用語「変調」は、過剰発現された場合の遺伝子発現の抑制、又は過小発現された場合の発現の増大を描いている。細胞の増殖障害が遺伝子発現に関連している場合は、翻訳レベルで遺伝子発現を妨害している核酸配列を使用することができる。この方法は、例えばアンチセンス核酸リボザイム又はトリプレックス物質 (triplex agent) を用いて、核酸又はトリプレックス物質により mRNA を隠すか、又はリボザイムでこれを切断するか、のいずれかにより、特異的 mRNA の転写又は翻訳を阻害することができる。

アンチセンス核酸は、特異的 mRNA 分子の少なくとも一部と相補的である DNA 又は RNA 分子である (Weintraub, Sci. Am., 262: 40 (1990))。細胞において、アンチセンス核酸は、対応する mRNA にハイブリダズし、2本鎖分子を形成する。細胞は2本鎖 mRNA を翻訳しないので、アンチセンス核酸は mRNA の翻訳を妨害する。約15個以上のヌクレオチドのアンチセンスオリゴマーが、容易に合成され、かつ恐らく標的細胞に組入れられた際により大きい分子よりも問題を引き起こすことが少ないので、好ましい。遺伝子の *in vitro* 翻訳を阻害するためのアンチセンス法の使用は、当該技術分野において周知である

(Marcus-Sakura, Anal. Biochem., 172: 289 (1988))。

アンチセンス核酸は、アルツハイマー病において蓄積するアミロイド前駆体タンパク質のような変異タンパク質又はドミナントアクティブ遺伝子産物の発現をブロックするために使用することができる。このような方法は、更にハンチントン病、遺伝性パーキンソン病及び他の疾患の治療についても有用である。アンチセンス核酸は、毒性に関連したタンパク質の発現の阻害についても有用である。

転写を停止するためのオリゴヌクレオチドの使用は、オリゴマーが二重らせん DNA の周りに巻きつき、3本鎖らせんを形成するトリプレックス戦略として公知のメカニズムによることができる。従って、トリプレックス化合物は、選択された遺伝子上の独自の部位を認識するように設計することができる (Maherら, Antisense REs and Dev., 1 (3) 227 (199

1) ; Helene, Anticancer Drug Dis. , 6 (6) : 569 (1991))。

リボザイムとは、他の1本鎖RNAをDNA制限エンドヌクレアーゼに類似の方法で特異的に切断する能力を有するRNA分子である。これらのRNAをコードしているヌクレオチド配列の修飾を通じて、RNA分子において特異的ヌクレオチド配列を認識し切断する分子を操作することが可能である (Cech, J. Amer. Med. Assn. , 260 : 3030 (1988))。このような方法の大きい利点は、特定の配列を有するmRNAのみが不活性化されることである。

生体反応調節剤をコードしている核酸を導入することが望ましい。この範疇に含まれるのは、「インターロイキン」に分類される多くのサイトカイン類、例えばインターロイキン1から12をコードしている核酸を含む免疫賦活剤である。更にこの範疇に含まれるのは、必ずしも同じメカニズムに従って作用するものではないが、インターフェロン、特にγインターフェロン (γ-IFN) であり、腫瘍壊死因子 (TNF) 及び顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) である。このような核酸が骨髄細胞又はマクロファージに送達され、先天性の酵素欠損又は免疫不全を治療することが望ましい。増殖因子、毒素性ペプチド、リガンド、受容体又は他の生理学的に重要なタンパク質をコードしている核酸も、特異的非分裂細胞に組入れることができる。

従って、本発明の組換えレンチウイルスは、抗HIV-分子によりHIV-感染細胞 (例えばT細胞又はマクロファージ) を治療するために使用することができる。加えて、例えば気道上皮を、嚢胞性繊維症の治療のために、嚢胞性繊維症トランスメンブランコンダクタンス調節 (CFTR) 遺伝子を有する本発明の組換えレンチウイルスにより感染することができる。

本発明の方法は、更にex vivoでの本発明の組換えレンチウイルスに感染した細胞の移植、又は中枢神経系もしくは脳室洞 (ventricular cavity) への又は宿主脳の表面の硬膜下へのin vivoでの感染に関連している、神経細胞、グリア細胞、繊維芽細胞又は間充細胞の移植 (transplantation) 又は「グラフト」に有用である。このようなグラフ

ト化に関する方法は、当業者には周知であり、かつBjorklund及びStenevi編集のNeural Grafting in the Mammalian CNS (1985年)に記載されている。

タンパク質産物の欠損に起因する疾患に関して、遺伝子導入は、代償療法のために正常遺伝子を感染組織へ組入れることができ、更にはアンチセンス変異を用いた疾患のための動物モデルを作製することができる。例えば、筋肉、脾臓又は肝臓細胞の感染のためには、ファクターVII又はIXをコードする核酸をレンチウイルスに挿入することが望ましい。

プロモーター配列は、所望の遺伝子配列に対して同種又は異種であることができる。広範なプロモーター類を利用することができ、これはウイルス又は哺乳類のプロモーターを含む。細胞又は組織に特異的なプロモーターは、特異的細胞集団における遺伝子配列の発現の標的指向化に利用することができる。本発明に適した哺乳類又はウイルスプロモーターは、当該技術分野において入手することができる。

任意に、クローニング段階の間に、パッケージングシグナル及び異種クローニング部位を有する導入ベクターと称される核酸構築物は、更に選択マーカー遺伝子を含む。マーカー遺伝子は、該ベクターの存在を調べるために利用され、その結果感染又は組込みが確認される。マーカー遺伝子の存在は、該挿入物を発現している宿主細胞のみの選択及び増殖を保証する。典型的な選択遺伝子は、抗生物質又は他の毒物、例えばヒスチジノール、プロマイシン、ハイグロマイシン、ネオマイシン、メトトレキセートなどに対する耐性を付与するタンパク質、及び細胞表面マーカーをコードしている。

本発明の組換えウイルスは、哺乳類細胞に核酸配列を導入することが可能である。用語「核酸配列」は、本願明細書において詳細に論ぜられるように、いずれかの核酸分子、特にDNAを意味する。核酸分子は、DNA、cDNA、合成DNA、RNA又はそれらの組合せを含む様々な起源に由来することができる。このような核酸配列は、天然のイントロンを含むこともあり、含まないこともあるようなゲノムDNAを包含し得る。更にこのようなゲノムDNAは、プロモーター領域、ポリA配列又は他の関連する配列に関連して得ることができる。ゲノム

DNAは、当該技術分野において周知の手段により、適当な細胞から抽出及び精製することができる。あるいは、メッセンジャーRNA (mRNA) は、細胞から単離し、逆転写又は他の手段によりcDNAを作製するために使用することができる。

好ましくは、本発明の方法で作製された組換えレンチウイルスは、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の誘導体である。このenvはHIV以外のウイルスに由来するであろう。

本発明の方法は、いくつかの実施態様において、前述のように、例えばgag、pol、env、tat及びrevのような組換えビリオンのパッケージングに必要な全ての機能をもたらす3種のベクターを提供する。本願明細書において記したように、tatは、予想外の利点を機能的に欠失し得る。これらのベクターがパッケージング細胞株の形質転換及び作出に使用され、組換えレンチウイルスを生じる限りは、使用されるベクターの数に制約はない。

前述のベクターは、トランスフェクション又は感染によりパッケージング細胞株に組入れられる。このパッケージング細胞株は、該ベクターゲノムを含むウイルス粒子を産生する。トランスフェクション又は感染の方法は、当業者には周知である。パッケージングベクター及び導入ベクターのパッケージング細胞株への同時トランスフェクション後、当業者によって用いられる常法により組換えウイルスは培養培地から回収され、かつ力価測定される。

従って、このパッケージング構築物は、リン酸カルシウムトランスフェクション法、リポフェクション法又は電気穿孔法により、通常はneo、DHFR、Glnシンテターゼ又はADAのようなドミナントな選択マーカーと一緒に、ヒト細胞株に導入し、その後適当な薬物の存在下で選択しかつクローンを単離することができる。これらの選択マーカー遺伝子は、該構築物の中のパッケージング遺伝子に物理的に連結することができる。

パッケージング機能が適当なパッケージング細胞によって発現されるように設計された安定した細胞株は公知である。例えばパッケージング細胞について開示した米国特許第5,686,279号;及びにOrayらの論文(Proc. Natl. Acad. Sci., 93:11400-11406 (1996))を

参照のこと。

前記Zuffereyらの論文は、HIV-1 env遺伝子を含むpolの3'側配列が欠失しているレンチウイルスパッケージングプラスミドを示している。この構築物は、tat及びrev配列を含み、かつ3'側LTRはポリA配列で置換されている。5'側LTR及びpsi配列は、誘導性であるもののような別のプロモーターによって置換されている。例えば、CMVプロモーター又はそれらの誘導体を使用することができる。

問題のパッケージングベクターは、レンチウイルスタンパク質の発現を増強しかつ安全性を増強するために、パッケージング機能を更に変更することを含む。例えばgagの上流のHIV配列は全て除去することができる。更にenvの下流の配列も除去することができる。更に、RNAのスプライシング及び翻訳を増強するために、ベクターを修飾する工程を行うことができる。

複製コンピテントなレンチウイルスの作出の可能性がよりごくわずかであるベクターを提供するために、本発明は、転写機構によりウイルス発現を促進する調節タンパク質であるtat配列が機能的に欠失されているようなレンチウイルスパッケージングプラスミドを提供する。その結果、tat遺伝子が、一部又は全て欠失されるか、もしくは様々な点突然変異又は他の突然変異がtat配列に生じ、遺伝子を非機能性にする。技術者は、tat遺伝子を非機能性にする公知の技術を実践することができる。

ベクターの構築並びに細胞のトランスフェクション及び感染に使用される技術は、当該技術分野において広範に実践されている。実施者は、特定の条件及び手順を説明する標準の手段材料を熟知している。しかし、便宜上、下記の段落においてガイドラインを示す。

本発明のベクターの構築には、当該技術分野において周知の標準的連結及び制限法を用いる (Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、コールドスプリングハーバー、NY、1982年を参照のこと)。単離されたプラスミド、DNA配列又は合成されたオリゴヌクレオチドは、切断し、望ましい形状に適合させかつ再連結する。

位置特異的DNA切断は、当該技術分野において理解される条件下、及び特別

な場合は市販の制限酵素の製造業者の指定する条件下で、適当な制限酵素（又は酵素類）で処理することによって行われ、これについては、例えばNew England Biolabs社の製品カタログを参照のこと。一般に、プラスミド又はDNA配列約1 μ gを、約20 μ lのバッファー液中で酵素1ユニットで切断する。典型的には、制限酵素の過剰量を用いて、DNA基質の完全な消化を確実にする。およそ37℃で約1～2時間のインキュベーション時間が実行可能であるが、その変形も許容することができる。各インキュベーション後、フェノール/クロロホルムを用いる抽出によりタンパク質を除去し、その後エーテルで抽出し、かつ核酸を水性画分からエタノール沈殿により回収する。所望であるならば、切断された断片のサイズ分離を、常法を用いポリアクリルアミドゲル又はアガロースゲル電気泳動により行うことができる。サイズ分離の一般的説明は、Method of Enzymology、65:499-560 (1980) に見ることができる。

制限切断された断片は、50mM Tris (pH7.6)、50mM NaCl、6mM MgCl₂、6mM DTT及び5～10 μ M dNTPの中で、20℃で約15～25分のインキュベーション時間を用いた、4種のデオキシヌクレオチド3リン酸 (dNTP) の存在下における、E. coli DNAポリメラーゼIの巨大断片（クレノウ）による処理により平滑末端であり得る。クレノウ断片は、5' の粘着末端を満たすが、たとえ4種のdNTPが存在したとしても、突出している3' 側の1本鎖を砕いてしまう (chew back)。所望であるならば、選択性の修復が、粘着末端の性質によって指示された制約内で、唯一のdNTPの、又は選択されたdNTPの供給によって行わうことができる。クレノウによる処理後、この混合物はフェノール/クロロホルムで抽出され、エタノール沈殿される。適当な条件下でのS1ヌクレアーゼ又はBal-31による処理は、いずれかの1本鎖部分の加水分解を生じる。

連結は、下記の標準条件及び温度下で、容量15～50 μ lの中で行うことができる：20mM Tris-Cl pH7.5、10mM MgCl₂、10mM DTT、33mg/ml BSA、10mM-50mM NaCl、及び40 μ M ATP、0.01～0.02 (Weiss) ユニットのT4 DN

Aリガーゼを用い0℃（「粘着末端」の連結）又は1mM ATP、0.3～0.6（Weiss）ユニットのT4 DNAリガーゼを用い14℃（「平滑末端」の連結）のいずれか。分子内「粘着末端」の連結は、通常総DNA濃度33～100 μ g/mlで行われる（総末端濃度5～100mM）。分子内平滑末端の連結は、（通常10～30倍のモル過剰量のリンカーを用いて）1 μ Mの総末端濃度で行われる。

従って、本発明において、レンチウイルスパッケージングベクターは、プロモーター及び、gag、pol、rev、env又はそれらの組合せ、並びにtatの特異的機能の又は実際の削除を伴うような、当業者によって決定された他の任意又は必要な調節配列、及び任意に他のレンチウイルスアクセサリ遺伝子を含むように作出される。

レンチウイルス導入ベクター（Naldiniら、前記；Proc. Natl. Acad. Sci.、93：11382-11388（1996））は、in vitroにおいてヒト細胞を増殖抵抗性（growth-arrested）に感染するために、及び成体ラットの脳へ直接注射した後に神経を形質導入するために使用されている。このベクターは、in vivoにおける神経へのマーカー遺伝子導入時の効率がよく、かつ検出可能な病理が存在しない場合に長期間発現が達成される。これまで試験した中で最長である該ベクターの単回注射後10ヶ月間にわたって分析した動物は、導入遺伝子発現の平均レベルにおいて減少を示さず、かつ組織病理又は免疫反応の徴候を示さなかった（Blomerら、J. Virol.、71：6641-6649（1997））。非分裂細胞を形質導入するベクターの能力を損なうことなく、HIVビルレンス遺伝子であるenv、vif、vpr、vpu及びnefが欠失されたレンチウイルスベクターの改善されたバージョンが開発されている。多様に減弱されたバージョンは、該ベクターの生体安全性の実質的改善を示している（Zuffereyら、前記）。

形質導入された細胞においては、組込まれたレンチウイルスベクターは、一般に各末端にLTRを有する。5'側LTRは、特にHIV-感染細胞において、組換えの基質となり得る「ウイルス性」転写物の蓄積を引き起こすことがある。

3'側LTRは、細胞のプロトオンコジーンを活性化した結果生じる危険性を伴う下流の転写を促進する。

U3配列は、HIV LTRの大部分を含む。このU3領域は、感染細胞における及び細胞活性化に反応したHIVゲノムの基本的かつ誘導された発現を変調するエンハンサーエレメント及びプロモーターエレメントを含む。プロモーターエレメントのいくつかは、ウイルス複製には必須である。エンハンサーエレメントの一部は、ウイルス単離体において高度に保存され、かつウイルス病原性の重大なビルレンス因子であることが示されている。エンハンサーエレメントは、ウイルスの様々な標的細胞において、複製率に影響を及ぼすように作用することができる (Marthasら、J. Virol.、67:6047-6055 (1993))。

ウイルス転写は5'側LTRのU3領域の3'末端から始まるので、これらの配列は、ウイルスmRNAの一部ではなく、かつ3'側LTR由来のそれらのコピーは、組込まれたプロウイルスにおいて両LTR生成の鋳型として作用する。U3領域の3'コピーがレトロウイルスベクター構築物において変更される場合は、このベクターRNAは依然プロデューサー細胞の完全な5'側LTRから産生されるが、標的細胞において再生することはできない。このようなベクターの形質導入は、子孫ウイルスにおいて両LTRの不活性化を生じる。従ってレトロウイルスは、自己不活性 (SIN) であり、かつこれらのベクターはSin導入ベクターとして公知である。

しかしながら、3'側LTRの欠失の程度には制限がある。第一に、U3領域の5'末端は、組込みに必要である、ベクター導入における他の本質的機能を提供する (末端のジヌクレオチド+att配列)。従って末端ジヌクレオチド及びatt配列は、欠失されているU3配列の5'側境界を示すことができる。加えて、一部の曖昧に定義された領域は、R領域下流のポリアデニル化部位の活性に影響を及ぼすことができる。3'側LTRのU3配列の過剰な欠失は、プロデューサー細胞におけるベクターの力価及び標的細胞における導入遺伝子の発現の両方に対し、有害な結果を伴うベクター転写物のポリアデニル化を減少することができる。他方、限定された欠失は、形質導入された細胞においてLTRの転写活

性を無効にすることはできない。

本願明細書において説明したレンチウイルス導入ベクターの新規バージョンでは、3'側LTRのU3領域の増加する欠失を保持している(図1:U3 LTRのヌクレオチド-418から指定された位置までのU3欠失の長さ:SIN-78、SIN-45、SIN-36及びSIN-18)。プロデューサー細胞におけるベクターの力価及び標的細胞における導入遺伝子の発現のいずれも損なうことなく、3'側LTRからのU3配列のほぼ完全な欠失を有するレンチウイルスベクターが開発された。最も広範な欠失(-418から-18)は、TATAボックスにまで及び、その結果形質導入された細胞のLTRの転写活性が無効になっている。従って、3'側の欠失に関するより低い限界は、TATAボックスを含む位置まで及ぶ。この欠失は、R領域までのU3領域の残りである。これは、ベクターの安全性が劇的に増すことを意味している。様々な欠失が当該技術分野において公知の実施法により作出された。

驚くべきことに、導入遺伝子の平均の発現レベルは、より完全なベクターと比べて、SINベクターによって形質導入された細胞においてでさえ高かった。これは恐らく、内部プロモーター上の上流HIV LTRから転写の妨害が除かれたためであろう。このようなU3領域の広範囲の欠失を伴うSIN型ベクターは、形質導入効率を損なうことなく、マウス白血病ウイルス(MLV)を基にしたレトロウイルスベクターについて作出することはできない。

導入ベクターの5'側LTRは、異種エンハンサー/プロモーターを伴うU3領域の転写調節エレメントの一部又は全部を置換することによって修飾された。この変更は、プロデューサー細胞における導入ベクターRNAの発現を増強するように; HIVのtat遺伝子不存在下でのベクターの作製を可能にするように; 並びに、前述のSINベクターを「救出」するための3'側が欠失したバージョンと再結合することができる上流のHIV LTRの野生型コピーを除去するように作出された。

従って、5'側LTRに前述の変更を含むベクターである5'ベクターは、発現を増強する配列及びtatを発現しないパッケージング細胞との組合せのために、導入ベクターとしての使用を見出すことができる。

このような5'ベクターは、更に先に説明したように3'側LTRに修飾を保持することもでき、単に発現が増強されず、tatを発現しないパッケージング細胞において使用することができるだけでなく、更に自己不活性化することができるような改善された導入ベクターを生じる。

HIV LTRからの転写は、tatタンパク質のトランスアクチベーター機能に高度に依存している。プロデューサー細胞に存在するコアパッケージング構築物によってしばしば発現されるtatが存在する場合、HIV LTRからのベクターの転写は強力に刺激される。完全な長さの「ウイルス」RNAは、パッケージングシグナルの完全な相補性を有しているので、このRNAは効率的にベクター粒子中でキャプシド形成され、かつ標的細胞に導入される。プロデューサー細胞のパッケージングによって利用できるベクターRNAの量は、感染性ベクター作製の律速段階である。

5'側LTRのエンハンサー領域又はエンハンサー及びプロモーター領域は、各々、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) 又はマウスラウス肉腫ウイルス (RSV) のエンハンサー又はエンハンサー及びプロモーターにより置換された。該構築物の概略及びハイブリッドベクターのコード名については、図2を参照のこと。CCL及びRRLベクターは、5'側U3領域が完全に置換されている。

対照のレンチベクターHR2及び5'側ハイブリッドのパネルを、導入ベクターによりトランスフェクションされたプロデューサー細胞において、tatトランスアクチベーターを提供するパッケージング構築物の存在下又は不存在下で、比較した。4種のキメラベクターの転写レベルは、パッケージング構築物の存在下及び不存在下の両方で、対照レンチベクターのそれよりも高い。全てのキメラベクターは、導入遺伝子を標的細胞に効率的に導入し、かつRRLベクターは対照HR2ベクターと同様に作用する。最後に、ベクターの標的細胞への組込みを、形質導入後の初期及び後期継代時に形質導入された細胞を調べることにより確認した。そのベクターが組込まれたことを示す導入遺伝子陽性細胞の割合に減少は認められなかった。

パッケージング構築物不存在下でプロデューサー細胞において得られた5'側LTRが修飾された導入ベクターRNAの高レベルの発現は、作製されるベクタ

一が機能性tat遺伝子の不存在下で機能していることを示している。先に本願明細書において説明したパッケージングプラスミドについて示されたtat遺伝子の機能欠損は、tatタンパク質に関連した多くの病理活性が授けられたレンチウイルスベクターシステムに対するより高レベルの生体安全性をもたらすであろう。従って、生体安全性が顕著に改善されたレンチウイルスベクターは、5'末端又は3'末端のいずれにもHIV LTRの野生型コピーを有さないSIN導入ベクターであり、これは本願明細書において説明したtat不含有パッケージングベクターと共同して使用される。

ウイルス上清は、トランスフェクションの48時間後の上清のろ過のような常法を用いて回収される。ウイルスの力価は、例えば適量のウイルスの上清による、 10^6 個のNIH 3T3細胞又は 10^5 個のHeLa細胞の感染により、ポリブレン（シグマケミカル社、セントルイス、MO） $8\mu\text{g}/\text{ml}$ の存在下で測定される。48時間後、形質導入効率がアッセイされる。

このように本発明は、高力価組換えウイルスを作製する方法及び手段を提供する。このようなウイルス粒子調製物を用いて、当該技術分野において公知の方法により標的細胞を感染することができる。従って本発明は、標的細胞が宿主から取り出され、公知の方法を行い培地において形質転換され、その後該宿主に戻されるような、ex vivo遺伝子治療の用途における使用を見出すであろう。

以下に記された本発明の詳細な説明は、本発明の様々な実施態様を示す限定を意図しない実施例である。

実施例1

レンチウイルスパッケージングプラスミドの構築

レンチウイルスパッケージングプラスミドは、前記Zuffereyらの論文において先に記されたプラスミドpCMV Δ R8.9 (Δ Vpr Δ Vif Δ Vpu Δ Nef) に由来した。pCMV Δ R8.9のnef遺伝子の残りの配列を、XhoI及びBstEIIによる消化により除去し、クレノウで満たし、かつ再連結した。この構築物の、100塩基対を欠失し、HIV-1の切断型envのリーディングフレームを、ゲノムインスリンのポリアデニル化部位に結合し、プラスミドpCMV Δ R8.73を得た。

本発明の別の実施態様において、プラスミドpCMVΔR8.73は、CMVプロモーターの下流のCMV由来の配列の133塩基対が欠失されている。この配列は、スプライスドナー部位を含み、かつこれはプラスミドpCMVΔR8.73のSacIIによる消化及びより大きい断片への再連結によって除去され、プラスミドpCMVΔR8.74が得られた。

別の本発明の実施態様においては、gag遺伝子の開始コドンの上流のプラスミドpCMVΔR8.74に残っているHIV-由来配列の、コンセンサス5'スプライスドナー部位以外の全てを除去した。同時に、gag遺伝子上流の配列を、最適翻訳効率で変更し、プラスミドpCMVΔR8.75を得た。pCMVΔR8.75は、pCMVΔR8.74に由来し、94塩基対のSstI-ClaI断片を、以下から成るSstI-ClaIオリゴヌクレオチドリンカーで置き換えることによって得た：5'-GGGACTGGTGAGTGAATTCGAGATCTGCCGCCGCCATGGGTGCGAGAGCGTCA GTATTAAGCGGGGGAGAATTAGAT-3' (配列番号：____) 及び5'-CGATCTAATTCTCCCCCGCTTAATACTGACGCTCTCGCACCCATGGCGGCGGCAGATCTCGAATTC ACTCACCAGTCCCGC-3' (配列番号：____)。

別の本発明の実施態様において、誘導可能なパッケージング構築物が、CMVプロモーターを含むpCMVΔR8.74のPstI-SacII断片を、最小のCMVプロモーターに連結したテトラサイクリンオペレーター配列の7個のタンデムコピーと置き換えることにより得た。tet-調節されたパッケージングプラスミドpTetΔR8.74を得た。

実施例2

レンチウイルス導入ベクターの構築

レンチウイルス導入ベクタープラスミドは、先にNaldiniらの論文 (Sci., 272:263-267 (1996)) に記されたプラスミドpHR'-CMV-LacZに由来した。pHR2は、pHR' 中の3'側LTRの上流のnef配列の124塩基対が、HIV1配列を減少しかつ導入遺伝子のクロニングが促進されるように両方のポリリンカーと置き換えられているような、レ

ンチウイルス導入ベクターである。pHR2は、pHR'-CMV-LacZに由来し、4.6 kb ClaI-StuI断片を、鋳型としてpHR'-CMV-LacZを用いかつオリゴヌクレオチドとして下記を使用するPCRにより作製された828塩基対のClaI-StuI断片の、pHR'-CMV-LacZ由来の4.4 kb StuI-NcoI断片及び4.5 kb NcoI-ClaI断片と3部位で連結したものと置き換えることによって得た；5'-CCATCGATCACGAGACTAGTCCTACGTATCCCCGGGGACGGGATCCGCGGAATTCCGTTTAAGAC-3'（配列番号：____）及び5'-TTATAATGTCAAGGCCTCTC-3'（配列番号：____）。

本発明の別の実施態様において、pHR3は、pHR2のRev反応エレメント（RRE）の上流のenvコード配列の148塩基対（ATGを含む）が欠失しているようなレンチウイルスベクターである。pHR3はpHR2に由来し、pHR2の839塩基対NotI-SpeI断片を、鋳型としてpHR2を用いかつオリゴヌクレオチドプライマーとして下記を使用するPCRにより得られた747塩基対NotI-SpeI断片と置き換えることによって得た：5'-GCGGCCGCAGGAGCTTTGTTTCCTT'GG-3'（配列番号：____）及び5'-TACGTAGGACTAGTCTCG-3'（配列番号：____）。

本発明の別の実施態様において、pRH5は、310塩基対gagコード配列（Gagタンパク質の15番目のアミノ酸の下流の全gagコード配列）がpHR2から欠失されているレンチウイルス導入ベクターである。pHR5は、pHR2のNruIによる消化、NotIリンカー（合成オリゴヌクレオチド5'-TTGCGGCCGCAA-3'、（配列番号：____））の付加、310塩基対の断片を切り出すためのNotIによる消化、その後の再連結によって得た。

本発明の別の実施態様において、pRH6は、パッケージすることが可能な完全な長さの転写物の産生を増強するために、5'側スプライスドナーシグナルが変異された（TGGTがTGATへ）レンチウイルスベクターである。pHR6はpHR5に由来し、239塩基対AflIIApoI断片を、鋳型としてpH

R2を用いかつオリゴヌクレオチドプライマーとして下記を使用するPCRにより作製された239塩基対AflI-ApoI断片によって置き換えることによって得た：5'-CCACTGCTTAAGCCT-3'（配列番号：_____）及び5'-CAAAATTTTTTGGCGTACTCATCAGTCGCCGCCCTCG-3'（配列番号：_____）。

全てのPCR断片は、直接TAクローニングベクターpCR2.1（インビトロゲン社）へのPCR反応産物の最初のクローニング、それに続く配列の検証及び適当な酵素による切り出しにより作製した。

実施例3

5'側LTRキメラレンチウイルス導入ベクターの構築

本発明の別の実施態様において、レンチウイルスベクターの5'側LTRは、HIV-1のR領域に結合したラウス肉腫ウイルス（RSV）のU3領域由来のエンハンサー及びプロモーターを含む（プラスミドpRRL）。pRRLは、オリゴヌクレオチドリンカーを用いて、RSVのエンハンサー及びプロモーター（転写開始位置に対してヌクレオチド-233から-1）がHIV-1のR領域に正確に融合されたようなレンチウイルス導入ベクターである。pRRLは、国際公開公報第97/07225号を参照し、プラスミドpRT43、RSV、F3及びpRH2に由来し、かつpRT43、RSV、F3の3.4kb EcoRI-HpaI断片を、pRH2の0.67kb BglII-NotI断片及びpRH2の1.7kb NotI-StuI断片で、5'-AATTGCCGCATTGCAGAGATATTGTATTTAAGTGCCTAGCTGATACAATAAACGGGTCTCTCTGGTTAGACCA-3'（配列番号：_____）及び5'-GATCTGGTCTAACCAGAGAGACCCGTTTATTGTATCGAGCTAGGCACTTAAATACAATATCTCTGCAATGCCGC-3'（配列番号：_____）のオリゴヌクレオチドからなる合成EcoRI-BglIIオリゴヌクレオチドリンカーにより置き換えることによって得た。

本発明の別の実施態様において、レンチウイルスベクターの5'側LTRは、HIV-1のプロモーター領域（転写開始位置に対して-78塩基対の位置から

)に結合したラウス肉腫ウイルス(RSV)のエンハンサー(転写開始位置に対してヌクレオチド-233から-50)を含む(プラスミドpRLL)。

pRLLは、RSVのエンハンサーがHIV-1のプロモーター領域にオリゴヌクレオチドリンカーを用いて融合されたレンチウイルス導入ベクターである。

pRRLは、プラスミドpRT43、RSV、F3及びpHR2に由来し、かつpRT43、RSV、F3の3.4kb EcoRI-HpaI断片を、pRH2の0.724kb AlwNI-NotI断片及びpRH2の1.7kb NotI-StuI断片で、オリゴ5'-AATTGGAGGCGTGGCCTGGCGGGACTGGGGAGTGGCGAGCCCTCAGATC-3' (配列番号: _____) 及びオリゴヌクレオチド5'-CTGAGGGGCTCGCCACTCCCCAGTCCCGCCAGGCCACGCCTCC-3' (配列番号: _____) からなる合成EcoRI-AlwNIオリゴヌクレオチドリンカーにより置き換えることによって得た。

本発明の別の実施態様(プラスミドpCCL)において、レンチウイルスベクターの5'側LTRは、HIV-1のR領域に結合した、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)の直前の初期(immediate early)エンハンサー及びプロモーター(Boshartらの発表した(Cell, 41:521-530 (1985)) 転写開始位置に対してヌクレオチド-673から-1)を含む。pCCLは、プラスミドpRT43、2F3(米国特許第5,686,279号)及びpHR2に由来し、かつpRT43、2F3の3.8kb SstI-HpaI断片を、pRH2の1.7kb BglII-NotI断片及びpRH2の1.7kb NotI-StuI断片で、オリゴヌクレオチド5'-CGTTTAGTGAACCGGGGTCTCTCTGGTTAGACCA-3' (配列番号: _____) 及び5'-GATCTGGTCTAACCAGAGAGACCCCGGTTCACTTAAACGAGCT-3' (配列番号: _____) からなる合成SstI-BglIIオリゴヌクレオチドリンカーにより置き換えることによって得た。

本発明の別の実施態様(プラスミドpCCL)において、レンチウイルスベクターの5'側LTRは、HIV-1のプロモーター領域(転写開始位置に対して

ー78塩基対位から)に結合したサイトメガロウイルス(CMV)の転写開始位置に対して-220から-673のエンハンサーヌクレオチドを含む。pCLLは、プラスミドpRT43、2F3及びpHR2に由来し、かつpRT43、2F3の3.6kb NcoI-HpaI断片を、pRH2の0.724kb AlwNI-NotI断片及びpRH2の1.7kb NotI-StuI断片で、オリゴ5'-CATGGAGGCGTGGCCTGGGCGGGACTGGG GAGTGGCGAGCCCTCAGATC-3' (配列番号: _____ 及び5'-CTGAGGGCTCGCCACTCCCCAGTCCCGCCCAGGCC ACGCCTC-3' (配列番号: _____) からなる合成NcoI-AlwNIオリゴヌクレオチドリンカーにより置き換えることによって得た。

実施例4

自己不活性化するレンチウイルスベクターの構築

pRRL.SIN-18はpRRLに由来し、消化及び再連結により3'LTRにおける400塩基対EcoRV-PvuII断片が欠失された。

pRRL.SIN-36はpRRLに由来し、3'側LTRの493塩基対BbsI-AlwNI断片を、合成オリゴヌクレオチド5'-GATATGATCAGATC-3' (配列番号: _____) 及び5'-CTGATCA-3' 並びにpRRL由来の0.54kb AlwNI-AvrII断片及び6.1kb AverII-BbsI断片との3部位の連結からなるオリゴヌクレオチドリンカーにより置き換えることによって得た。

pRRL.SIN-45はpRRLに由来し、3'側LTRの493塩基対BbsI-AlwNI断片を、合成オリゴヌクレオチド5'-GATATGATCAGAGCCCTCAGATC-3' (配列番号: _____) 及び5'-CTGAGGGCTCTGATCA-3' (配列番号: _____) 並びにpRRL由来の6.1kb AlwNI-AvrII断片及び6.1kb AverII-BbsI断片との3部位の連結からなるオリゴヌクレオチドリンカーにより置き換えることによって得た。

pRRL.SIN-78はpRRLに由来し、3'側LTRの493bp BbsI-AlwNI断片を、5'-GATATGATCAGGAGGCGTGG

CCTGGGCGGGACTGGGGAGTGGCGAGCCCTCAGATC
 -3' (配列番号; ____) 及びオリゴヌクレオチド5' -CTGAGGGCTC
 GCCACTCCCCAGTCCCGCCCAGGCCACGCCTCCTGA
 TCA-3' (配列番号; ____) 並びにpRRL由来の0.54kb AlwN
 I-AvrII断片及び6.1kb AverII-BbsI断片との3部位の
 連結からなるオリゴヌクレオチドリinkerにより置き換えることによって得た。

実施例5

安定したレンチウイルスパッケージング細胞00-28の構築及びレンチウイルス
 スペクターの安定した産物

293G細胞株を用いて、安定したレンチウイルスパッケージング細胞を作製
 した。293G細胞は、MDカセット (CMVプロモーター、並びにヒトβグロ
 ビン遺伝子由来の介入配列-エクソン2及び3、イントロン2-及びポリ (A)
 部位) からのtet^R/VP16トランスアクチベーター、並びに7個のテトラ
 サイクリンオペレーター部位 (tet^O) の縦列反復配列に連結した最小のCM
 Vプロモーター由来のVSVエンベロープを発現する。従って、VSV Gの発
 現は、培養培地のテトラサイクリン濃度により調節され、この抗生物質が存在す
 る場合には抑制される (Gossen及びBujard, Proc. Natl.
 Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992); Oryら
 、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:11400-114
 06 (1997))。293G細胞は、通常10%ドナーウシ血清を補充し、か
 つ1μg/mlテトラサイクリンを含有するDMEM/低濃度グルコース培養培
 地中で維持される。293G細胞の15cmプレートを、リポフェクタミン (G
 IBCO BRL) を用い、パッケージングプラスミドpCMVΔR8.74の
 13.36μg及び選択プラスミドpZeoSV2の1.33μgで、トランス
 フェクションした。この培地を24時間後に交換し、48時間後に細胞を、ゼオ
 シン250μg/ml及びテトラサイクリン1μg/mlを含有する培地に分け
 た。3~4週間選択した後、250クローンを採取し、96ウェルプレートに移
 し、かつこの培地を市販のキットを用いて、免疫捕獲によりHIV-1 p24
 Gag抗原についてスクリーニングした。52個のp24陽性クローンを更な

る分析のために増殖した。最良の5個のクローンが、 $12 \sim 23 \text{ ng/ml}$ のp24値を有することが決定された。これらの5個のクローンのうち4個は、ウェスタンブロット分析により、テトラサイクリン除去後、VSV-G発現について陽性であった。

更に4個のp24/VSV-G陽性クローンを、レンチウイルス導入ベクターをパッケージする能力について分析した。これらのクローンを、CMVプロモーターで起動されたA. Victoriaのグリーン蛍光タンパク質(GFP)の発現カセットを含む一過性に産生されたレンチウイルスベクター(VSV-G偽型)で、感染多重度10かつポリブレン($8 \mu\text{g/ml}$)存在下で、感染した。次に感染したクローンを拡張し(expanded)、テトラサイクリンを除去した。誘導の72時間後、24時間培地の収集を行い、上清をろ過し、急速凍結した。凍結した上清を、GFP遺伝子の形質導入について天然のHeLa細胞上で力価測定した。FACS分析により、パッケージングクローン00-28の感染によって生じた細胞集団(10-28と称される)は、最大の力価 5×10^4 形質導入単位(T.U.)/mlを有することが決定された。

感染されたパッケージング集団10-28を、GFPレンチウイルスベクターの高力価産生クローンの作出に用いた。10-28細胞は、FACSにより調べ、かつ最高のGFP発現細胞を保持し拡張した。その後この集団を、一過性に作製されたGFPレンチウイルス(VSV-G偽型)で更に4回、連続的に(「ピング(ping)」)感染した。各々感染した後、上清をVSV-G誘導の72～96時間後に収集した。上清を、HeLa細胞上で力価決定し、かつ免疫捕獲アッセイによりp24含量について分析した。感染力価は、3回目のピング後にピークを示し、 $1.5 \times 10^6 \text{ T.U./ml}$ に達した(図3参照)。3回目のピングからの細胞集団を、サブクロニングし、高力価ベクターのプロデューサーを単離した。

本願明細書に引用した論文及び特許出願は全て、個々の論文又は特許出願が明確かつ個別に参照として組込まれることが示されるように、それらの全体が本願明細書に参照として組込まれている。

本発明に関連する当業者には明らかであるように、本発明は、先に明確に示さ

れたもの以外の形、例えば、他の哺乳類細胞型のトランスフェクション及び形質導入も、本発明の精神又は本質的特長から逸脱することがない限りは包含している。従って前述の本発明の特定の実施態様は、例証のためであり制限するものではないとみなすべきである。本発明の範囲は、記したように、前述の説明において限定された実施例に制限されるものではなく、添付された特許請求の範囲である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:

(A) NAME: CELL GENESYS, INC.
 (B) STREET: 322 Lakeside Drive
 (C) CITY: Foster City
 (D) STATE: CA
 (E) COUNTRY: USA
 (F) ZIP: 94404

(ii) TITLE OF INVENTION: METHOD AND MEANS FOR PRODUCING HIGH
 TITR, SAFE, RECOMBINANT LENTIVIRUS VECTORS

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 22

(iv) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
 (B) COMPUTER: IBM PC compatible
 (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

(v) CURRENT APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: PCT Unassigned
 (B) FILING DATE: Concurrently Herewith

(iv) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: 08/989,394
 (B) FILING DATE: 12-DEC-1997

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 77 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

GGGACTGGTG AGTGAATTCG AGATCTGCCG CCGCCATGGG TGCAGAGCG TCAGTATTAA
 GCGGGGAGA ATTAGAT

60

77

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 81 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

CGATCTAATT CTCCTCCGCT TAATACTGAC GCTCTCGCAC CCATGGCGGC GGCAGATCTC 60
GAATTCAGTC ACCAGTCCCG C 81

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 65 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

CCATCGATCA CGAGACTAGT CCTACGTATC CCCGGGGACG GGATCCGCGG AATTCGTTT 60
AAGAC 65

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 20 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

TTATAATGTC AAGGCCTCTC 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 26 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

GCGGCCGCAG GAGCTTTGTT CCTTGG 26

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 18 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

TACGTAGGAC TAGTCTCG

18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 12 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

TTGCGGCCGC AA

12

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 15 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

CCACTGCTTA AGCCT

15

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 37 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

CAAAATTTT GCGTACTCA TCAGTCGCCG CCCCTCG

37

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 74 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

AATTGCCGCA TTGCAGAGAT ATTGTATTTA AGTGCCCTAGC TCGATACAAT AAACGGGTCT

60

CTCTGGTTAG ACCA

74

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 74 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:

GATCTGGTCT AACCAGAGAG ACCCGTTTAT TGTATCGAGC TAGGCACTTA AATACAATAT

60

CTCTGCAATG CGGC

74

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 50 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:

AATTGGAGGC GTGGCCTGGG CGGGACTGGG GAGTGGCGAG CCCTCAGATC

50

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 43 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

CTGAGGGCTC GCCACTCCCC AGTCCCGCCC AGGCCACGCC TCC

43

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 34 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:

CGTTTAGTGA ACCGGGGTCT CTCTGGTTAG ACCA

34

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:15:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 42 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:15:

GATCTGGTCT AACCAGAGAG ACCCGGTTT ACTAAACGAG CT

42

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:16:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 49 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:16:

CATGGAGGCC TGGCCTGGGC GGGACTGGGG AGTGGCGAGC CCTCAGATC

49

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:17:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 42 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:17:

CTGAGGGCTC GCCACTCCCC AGTCCCGCCC AGGCCACGCC TC

42

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:18:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 14 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:18:

GATATGATCA GATC

14

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:19:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 23 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:19:

GATATGATCA GAGCCCTCAG ATC

23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:20:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 16 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:20:

CTGAGGGCTC TGATCA

16

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:21:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 56 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:21:

GATATGATCA GGAGGCGTGG CCTGGGCGGG ACTGGGGAGT GCGAGCCCT CAGATC

56

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:22:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 49 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:22:

CTGAGGGCTC GCCACTCCCC AGTCCCGCCC AGGCCACGCC TCCTGATCA

49

【図面の簡単な説明】

【図1】 これは様々なレンチウイルスベクターを示す。RSVはラウス肉腫ウイルスエンハンサー／プロモーターであり；RはLTRのR領域であり；U5はLTRのU5領域であり；SDはスプライスドナー部位であり、例えばHIV 5' 主要スプライスドナー部位であり； ϕ はプサイキャプシド形成シグナル配列であり；Gaはgag遺伝子の一部であり；RREはrev反応性エレメントであり；SAはスプライスアクセプター配列であり；U3はLTRのU3領域である。

【図2】 これは、別のレンチウイルスベクターを示す。CMVはサイトメガロウイルスである。他の点では、記号は図1に示したものと同一である。

【図3】 これは、導入ベクターの量を漸増する場合の等級化されたベクター産

生を示すグラフである。

【図1】

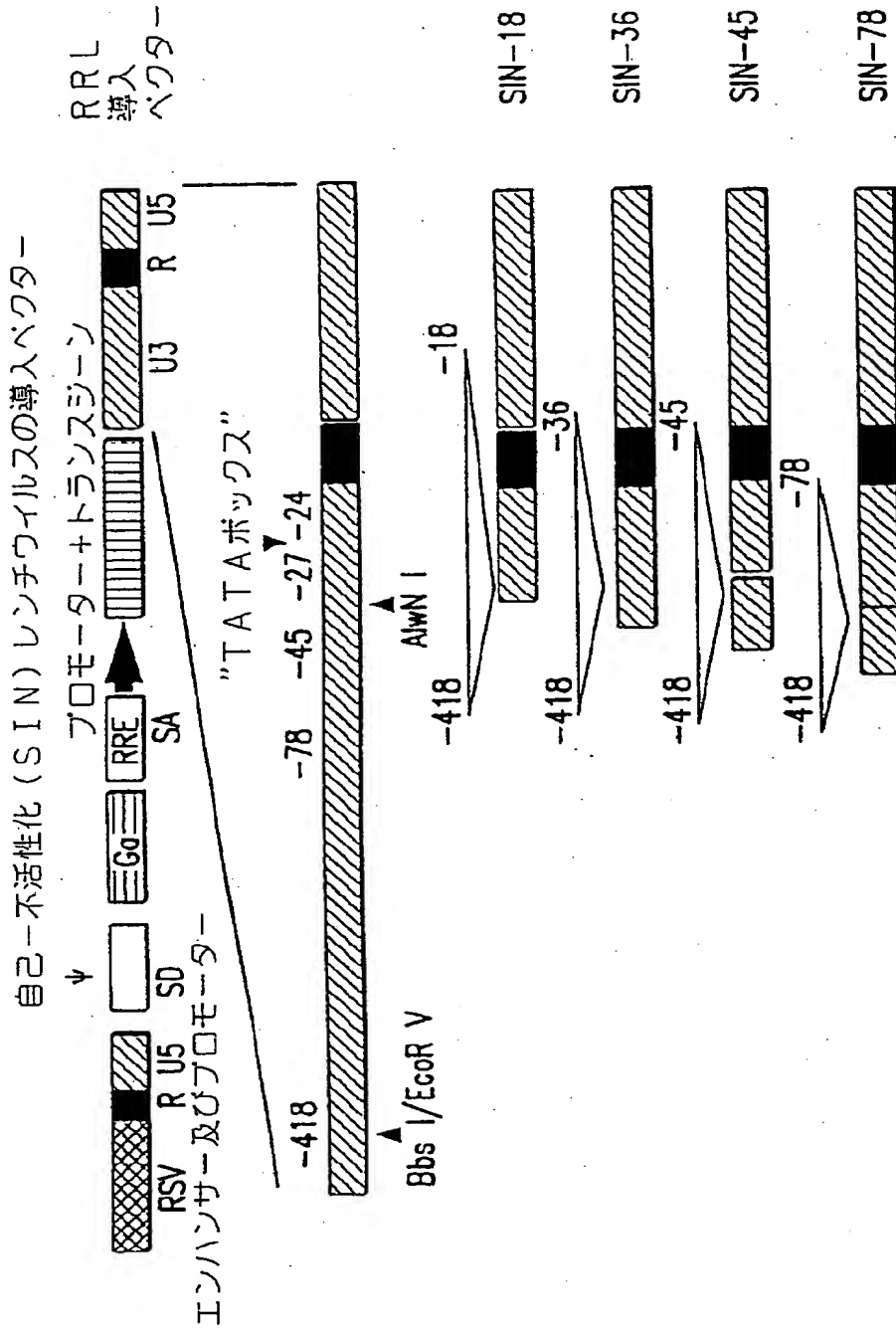


FIG.1

【図2】

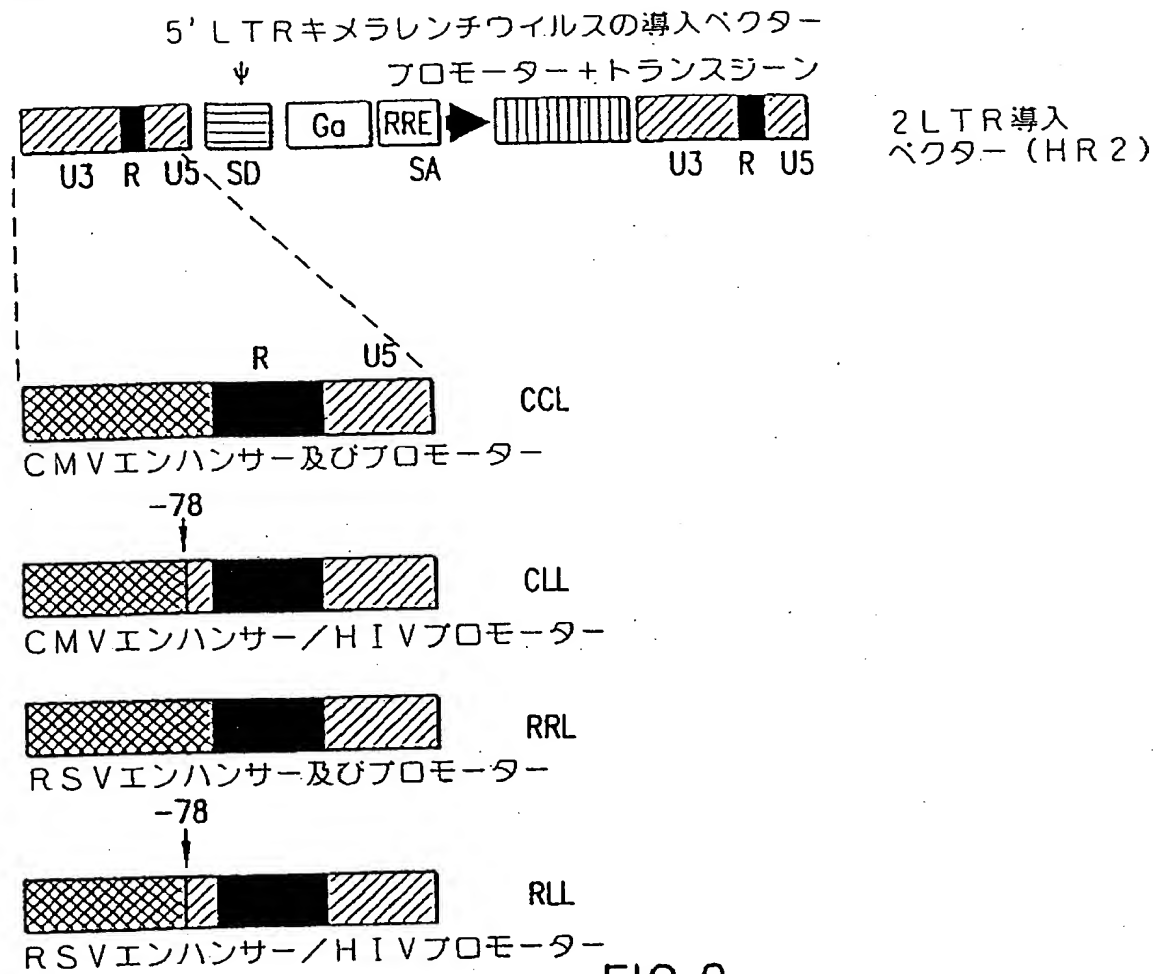


FIG.2

【図3】

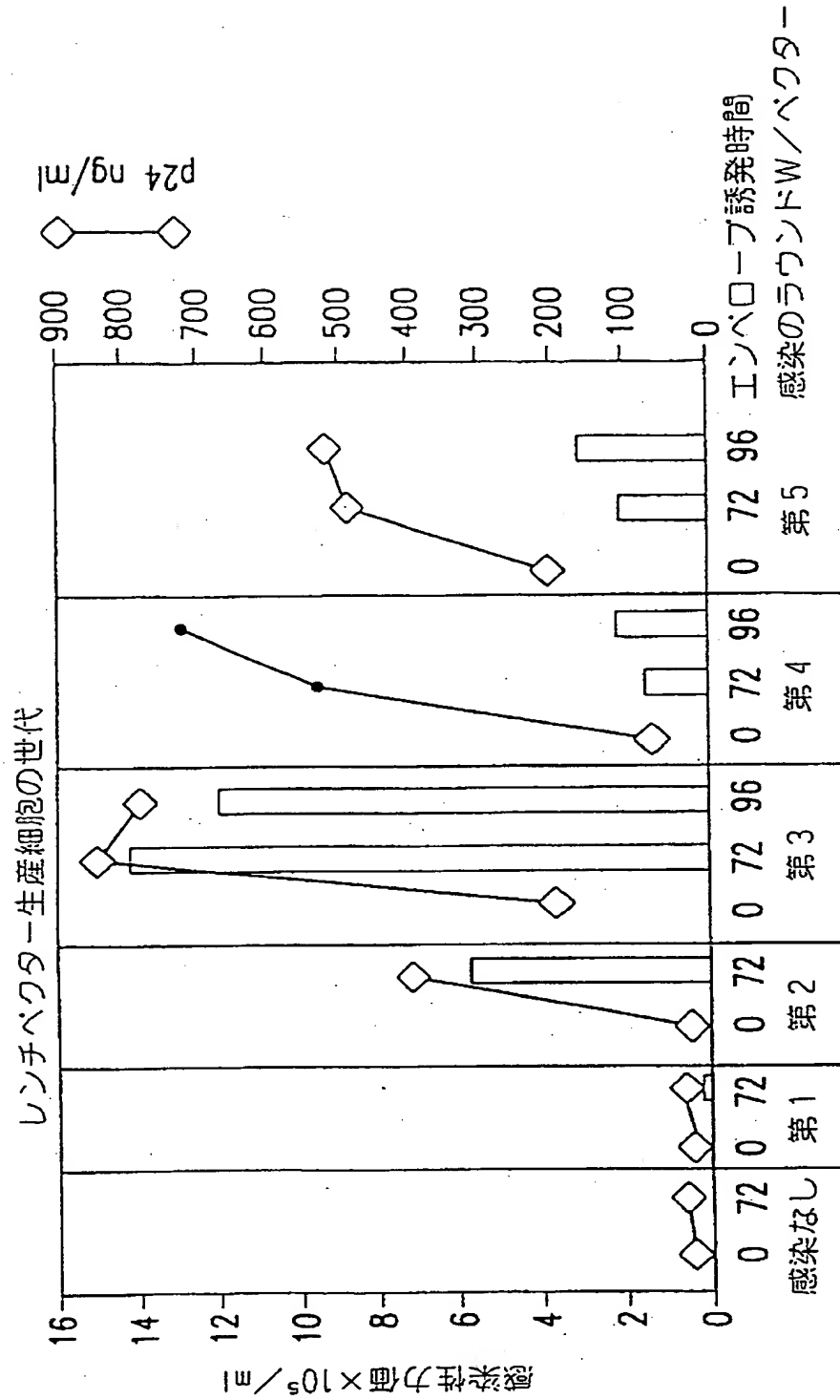


FIG.3

【手続補正書】

【提出日】平成12年6月27日(2000.6.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正内容】

【発明の名称】 高力価で安全な組換えレンチウイルスベクター作成の方法及び手段

【特許請求の範囲】

【請求項1】 各々がU3領域を有する5'側LTR及び3'側LTRを含むレンチウイルス導入ベクターであり、ここで5'側LTRのU3領域の調節エレメントの一部又は全てが、該レンチウイルスに対して内因性でなく、哺乳類細胞において操作できるように、他の調節エレメントによって置換されている、レンチウイルス導入ベクター。

【請求項2】 前記3'側LTRのU3領域の1個以上のヌクレオチド塩基が欠失されている、請求項1記載の導入ベクター。

【請求項3】 前記レンチウイルスに対して内因性でない調節エレメントが、サイトメガロウイルスのエンハンサー、プロモーター又はエンハンサー／プロモーターである、請求項1記載のベクター。

【請求項4】 前記レンチウイルスに対して内因性でない調節エレメントが、ラウス肉腫ウイルスのエンハンサー、プロモーター又はエンハンサー／プロモーターである、請求項1記載のベクター。

【請求項5】 前記欠失されたU3領域が、5'末端ジヌクレオチド及びatt配列以外の該U3領域の全てである、請求項2記載のベクター。

【請求項6】 前記欠失したU3領域が、TATAボックス配列を含む、請求項5記載のベクター。

【請求項7】 前記ベクターが発現された異種遺伝子を保持する、請求項1記載のベクター。

【請求項8】 前記レンチウイルスがヒト免疫不全ウイルス(HIV)である、請求項1記載のベクター。

【請求項9】 前記HIVがHIV-1である、請求項8記載のベクター。

【請求項10】 該レンチウイルスに対し内因性であるgagの上流の配列を欠失し、かつ該レンチウイルスに対し内因性であるenvの下流の配列を欠失している、レンチウイルスパッケージングプラスミド。

【請求項11】 前記プラスミドが発現されたgag遺伝子、発現されたpol遺伝子又は発現されたgag及びpol遺伝子を保持する、請求項10記載のパッケージングプラスミド。

【請求項12】 前記プラスミドが非機能性tat遺伝子を保持する、請求項10記載のパッケージングプラスミド。

【請求項13】 前記レンチウイルスがヒト免疫不全ウイルス(HIV)である、請求項10記載のパッケージングプラスミド。

【請求項14】 前記HIVがHIV-1である、請求項13記載のパッケージングプラスミド。

【請求項15】 下記工程を含む、組換えレンチウイルスベクターの製造法

- ：
- a) i) 該レンチウイルスに対し内因性であるgagの上流の配列を欠失し、かつ該レンチウイルスに対し内因性であるenvの下流の配列を欠失している、少なくとも1種のレンチウイルスパッケージングプラスミドであり、かつこれが発現されたgag遺伝子、発現されたpol遺伝子又は発現されたgag及びpol遺伝子を保持する少なくとも1種のパッケージングプラスミドであるもの；及び
 - ii) 該レンチウイルスに対して内因性でない発現されたenv遺伝子を保持する該レンチウイルスに対し内因性でない発現プラスミド；
- により細胞を形質転換し、パッケージング細胞を得る工程；
- b) 前記パッケージング細胞を、発現された異種遺伝子を保持するレンチウイルス導入ベクターにより複数の形質転換を行い、プロデューサー細胞を得る工程；
 - c) 前記プロデューサー細胞を培地において培養する工程；及び
 - d) 前記プロデューサー細胞を該培地から分離し、該組換えレンチウイルスベクタ

一を該培地から回収する工程。

【請求項16】 前記パッケージング細胞が非機能性tat 遺伝子を保持する、請求項15記載の方法。

【請求項17】 前記レンチウイルス導入ベクターが、各々がU3領域を有する5'側LTR及び3'側LTRを含み、ここで5'側LTRのU3領域の調節エレメントの一部又は全てが、該レンチウイルスに対して内因性でなく、哺乳類細胞において操作できるように、他の調節エレメントによって置換されている、請求項15記載の方法。

【請求項18】 前記3'側LTRのU3領域の1個以上のヌクレオチド塩基が欠失されている、請求項17記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、新規レンチウイルスパッケージングベクター、問題の外来遺伝子を保持する導入ベクター、安定したパッケージング細胞株、安定したプロドューサー細胞株、及び哺乳類細胞中で組換えレンチウイルスを産生するためのそれらの使用に関する。

発明の背景

レトロウイルスベクターは、遺伝子送達のための一般的道具である(Miller、Nature、357:455-460(1992))。レトロウイルスベクターの再編成されない単一コピー遺伝子を広い範囲の齧歯類、霊長類及びヒトの体細胞に送達する能力は、細胞への遺伝子導入に良く適したレトロウイルスベクターを作出する。

【0002】

組換えレトロウイルスベクターを作製するために有用な付属物は、感染性ビリオンの作製に必要なタンパク質をトランス(in trans)で供給するパッケージング細胞株であるが、このような細胞は、内因性のウイルスゲノム核酸をパッケージングすることが不可能である(Watanabe 及びTemin、Molec. Cell Biol.、3(12):2241-2249(1983)；Mannら、Cell、33:153-159(1983)；Embretson 及びTemin、J. Virol.、61(9):2675-2683(1987))。レトロウイルスパッケージング細胞株

の構築に関する考察は、齧歯類(Cloydら、J. Exp. Med., 151:542-552(1980))及び盃長類(Donahueら、J. Exp. Med., 176:1125-1135(1992))においてTリンパ球を産生することが示されている、組換えの複製コンピテントのレトロウイルス(RCR) を含まない高力価のベクターの上清の作製である。

【0003】

パッケージング細胞においてRCR の生成の可能性を最小にするひとつの方法は、パッケージング機能を2個のゲノム、例えば、一方はgag 及びpol 遺伝子産物を発現し、他方はenv 遺伝子産物を発現するものに分割することである(Bosselmanら、Molec. Cell Biol.、7(5):1797-1806(1987) ; Markowitz ら、J. Virol.、62(4):1120-1124(1988) ; Danos 及びMulligan、Proc. Natl. Acad. Sci.、85:6460-6464(1988))。この方法は、これらの2個のゲノムの同時パッケージング及びそれに続く導入の能力、更にはRCR を産生するための該パッケージング細胞における3個のレトロウイルスゲノムの存在に起因した組換え頻度を顕著に減少する能力を最小化する。

【0004】

組換え体が生じる事象において、いずれか可能性のある組換え体を機能なくするために望ましくない遺伝子産物内に変異(Danos及びMulligan、前記)又は欠失(Boselman ら、前記 ; Markowitz ら、前記)を設計することができる。加えて、両パッケージング構築物上の3'側LTR の欠失は、機能的組換え体を形成する能力も低下させる。

【0005】

レンチウイルスは、一般的なレトロウイルス遺伝子gag、pol 及びenv に加えて、調節又は構造機能を伴う他の遺伝子を含む複合レトロウイルスである。高度な複雑性は、潜伏感染期に、レンチウイルスがその生活環を変調することを可能にする。

典型的レンチウイルスは、AIDSの病原物質であるヒト免疫不全ウイルス(HIV)である。In vivo においてHIV は、リンパ球及びマクロファージのような分裂が稀である最終的に分化した細胞に感染することができる。In vitroにおいて、HIV は、単球由来マクロファージ(MDM) の初代培養、更にはアフィディコリン又は

γ線照射の処理によって細胞周期が抑制されたHeLa-Cd4細胞又はTリンパ球細胞に感染することができる。

【0006】

細胞の感染は、標的細胞の核膜孔を通じてのHIVの組込み前複合体の核への能動輸送に左右される。これは、標的細胞の核への輸送機構と、該複合体中の複数の部分的に多重複の分子決定基の相互作用によって生じる。同定された決定基は、gagマトリックス(MA)タンパク質、親核性の(karyophilic)ビリオン-関連タンパク質、vpr、及びgag MAタンパク質のC-末端ホスホチロシン残基の機能的核局在化シグナル(NLS)を含む。

発明の概要

従って、本発明は、パッケージできるレンチウイルスベクター転写物及び哺乳類細胞における高力価組換えレンチウイルスの迅速な作製のためのレンチウイルスタンパク質の両方の合成に関係する新規の安全化されたレンチウイルスベクターに関する。これらの結果は、問題の外来遺伝子を標的細胞へ送達するための感染性粒子である。本発明は更に、ウイルス産生のための細胞株を提供する。

発明の詳細な説明

本発明は、非分裂細胞を感染することが可能な組換えレンチウイルス、更にはこれを製造する方法及び手段を提供する。このウイルスは、核酸配列のin vivo及びex vivoにおける導入及び発現に有用である。

【0007】

レンチウイルスゲノム及びプロウイルスDNAは、レトロウイルスにおいて発見された3個の遺伝子を有する：gag、pol及びenvであり、これらには、2個の長い末端反復配列(LTR)が隣接している。gag遺伝子は、内部構造(マトリックス、キャプシド及びヌクレオキャプシド)タンパク質をコードし；pol遺伝子は、RNA-依存性DNAポリメラーゼ(逆転写酵素)、プロテアーゼ及びインテグラーゼをコードし；並びに、env遺伝子は、ウイルスのエンベロープの糖タンパク質をコードしている。5'及び3'側LTRは、ビリオンRNAの転写及びポリアダニル化を促進するのに利用できる。LTRは、ウイルス複製に必要な他のシス作用性配列を全て含む。レンチウイルスは、vif、vpr、tat、rev、vpu、nef及び

vpx (HIV-1、HIV-2 及び／又はSIV) を含む追加遺伝子を有する。

【0008】

5' 側LTR への隣接物は、ゲノムの逆転写に必要な配列 (tRNAプライマー結合部位) 及びウイルスRNA の粒子への効果的なキャプシド形成に必要な配列 (プサイ部位) である。キャプシド形成 (又はレトロウイルスRNA の感染ビリオンへのパッケージング) に必要な配列がウイルスゲノムから失われた場合は、このシス欠損は、ゲノムRNA のキャプシド形成を妨げる。しかし、得られる変異体は、依然全てのビリオンタンパク質の合成を指向することが可能である。

【0009】

本発明は、パッケージング機能、すなわちgag、pol 及びenv、更にはrev 及びtat を有する2種以上のベクターにより適当な宿主細胞へトランスフェクションすることを含む、非分裂細胞を感染することが可能な組換えレンチウイルスを作製する方法を提供する。以下に説明するように、機能性tat 遺伝子を欠いているベクターが、特定の用途のためには望ましい。従って、パッケージング細胞を産生するために、例えば第一のベクターは、ウイルス性gag 及びウイルス性pol をコードしている核酸を提供することができ、かつ別のベクターは、ウイルス性env をコードしている核酸を提供することができる。本願明細書において導入ベクターと同定される異種遺伝子を提供するベクターのパッケージング細胞への組入れは、問題の外来遺伝子を保持する感染性ウイルス粒子を放出するプロデューサー細胞を生じる。

【0010】

前述のベクターそれ自体は、本願明細書において開示された新規に構築されたベクターの範囲外であるが、これは当該技術分野において公知であり、Naldiniらの論文 (Sci., 272:263-267(1996)) ; 及びZuffereyらの論文 (Nat. Biotech., 15:871-875(1997)) を参照のこと。一般にこれらのベクターは、プラスミドをベースにした又はウイルスをベースにしたものであり、外来核酸の組入れ、核酸の選択及び宿主細胞への導入に必須の配列を保持するように設計されている。問題のベクターのgag、pol 及びenv 遺伝子も、当該技術分野において公知である。従って関連する遺伝子が、選択されたベクターにクローニングされ、その後

問題の標的細胞の形質転換に使用される。

【0011】

前述のベクター及び外来遺伝子の設計に従い、第二のベクターは、ウイルス性エンベロープ(env) 遺伝子をコードしている核酸を提供することができる。env 遺伝子は、レトロウイルスを含むあらゆるウイルスに由来することができる。好ましくはenv は、ヒト及び他種の細胞の形質導入を可能にする両種指向性エンベロープタンパク質である。

【0012】

このエンベロープタンパク質の抗体との結合、又は特定の細胞種のレセプターへの標的化のための特定のリガンドにより組換えウイルスを標的化することが望ましい。ウイルスベクターに問題の配列（調節領域を含む）を、例えば特異的標的細胞上の受容体のリガンドをコードしている他の遺伝子と共に挿入することにより、このベクターは標的特異性となる。レトロウイルスベクターは、例えば糖脂質又はタンパク質の挿入により、標的特異性に作製することができる。標的化は、抗体又は組換え抗体型分子、例えば1本鎖抗体などの抗原-結合部分を使用することにより達成され、レトロウイルスベクターを標的化する事が多い。当業者には、特異的標的へのレトロウイルスベクターの送達を達成する具体的な方法は公知であるか、又は過度の実験をすることなく容易に確かめるであろう。

【0013】

レトロウイルス由来のenv 遺伝子の例は、モロニー Maus 白血病ウイルス (MoMuLV 又は MMLV)、ハーベイ Maus 肉腫ウイルス (HaMuSV 又は HSV)、マウス乳がんウイルス (MuMTV 又は MMTV)、ギボンサル白血病ウイルス (GaLV 又は GALV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 及びラウス肉腫ウイルス (RSV) を含むが、これらに限定されるものではない。水泡性口内炎ウイルス (VSV) プロテイン G (VSVG)、肝炎ウイルス及びインフルエンザのそのような他の env 遺伝子も使用することができる。

【0014】

ウイルス性 env 核酸配列を提供するベクターは、例えばプロモーター又はエンハンサーのような調節配列に機能的に結合している。この調節配列は、真核生物

のプロモーターまたはエンハンサーであることができ、例えばモロニーマウス白血病ウイルスのプロモーター-エンハンサーエレメント、ヒトサイトメガロウイルスのエンハンサー又はワクシニアP7.5のプロモーターを含む。一部の場合は、モロニーマウス白血病ウイルスのプロモーター-エンハンサーエレメントのように、プロモーター-エンハンサーエレメントが、LTR 配列内に又はこれに隣接して位置する。

【0015】

好ましくはこの調節配列は、ベクターが構築されたレンチウイルスにとって内因性でないものである。従って、ベクターがSIV から作出された場合は、SIV LTR に認められるSIV 調節配列は、SIV を起源としない調節エレメントによって置き換えられるであろう。

VSV G は組換えウイルスに広範な宿主細胞の範囲を付与するので、VSV G タンパク質は望ましいenv 遺伝子であるが、VSV G は宿主細胞にとって有害であり得る。従って、VSV G に関する遺伝子のような遺伝子が使用される場合は、誘導性プロモーターシステムを使用し、その結果VSV G 発現が必要でない場合には、VSV G 発現を宿主毒性が最小になるように調節できるようにすることが好ましい。

【0016】

例えばGossen及びBujardの論文 (Proc. Natl. Acad. Sci., 89:5547-5551 (1992)) に記載されたテトラサイクリン-調節性遺伝子発現システムを用いて、テトラサイクリンが導入された細胞から取り除かれた場合にVSV G の誘導発現を提供するために利用することができる。従って、tet/VP16トランスアクチベーターは、第一のベクター上に存在し、かつVSV G をコードする配列は、別のベクター上のtet オペレーター配列によって制御されたプロモーターの下流にクローニングされる。

【0017】

異種又は外来の核酸配列である導入遺伝子は、調節核酸配列に操作できるように連結される。本願明細書において使用される用語「異種」核酸配列は、外来種を起源とする配列、又は同種に由来する場合にはこれが当初の形から実質的に修飾されていることを意味する。あるいは、細胞では通常は発現しない未変化の核

酸配列は、異種核酸配列である。

【0018】

用語「操作できるように連結」とは、調節配列と異種核酸配列が機能的に連結し、後者の発現を生じることを意味する。好ましくは、異種配列は、プロモーターに連結され、キメラ遺伝子を生じる。この異種核酸配列は、好ましくはウイルス性LTR プロモーター—エンハンサーシグナル又は内部プロモーターのいずれかの制御下にある、レトロウイルスLTR 内に保持されたシグナルは、依然導入遺伝子の効果的発現をもたらすことができる。

【0019】

前記外来遺伝子は、転写することができる問題の核酸のいずれかであることができる。一般に外来遺伝子はポリペプチドをコードしている。このポリペプチドは、何らかの治療上の利点があるものが好ましい。ポリペプチドは、宿主細胞において、内因性タンパク質の発現の欠損又は不存在を補うことができる。このポリペプチドは、宿主細胞に新たな特性、例えば米国特許第5,359,046 号に開示されたキメラシグナル受容体などを与えることができる。技術者は、本願明細書に記載しかつ当該技術分野において公知である技術を実践し外来遺伝子の適性を決定することができる。例えば、技術者は、外来遺伝子はキャプシド形成に適した大きさかどうか、及び外来遺伝子産物が適切に発現されるかどうかということを知っているであろう。

【0020】

本発明の方法による分子の組入れにより細胞において分子を調節する遺伝子の発現を変調することが望ましい。用語「変調」は、過剰発現された場合の遺伝子発現の抑制、又は過小発現された場合の発現の増大を描いている。細胞の増殖障害が遺伝子発現に関連している場合は、翻訳レベルで遺伝子発現を妨害している核酸配列を使用することができる。この方法は、例えばアンチセンス核酸リボザイム又はトリプレックス物質(triplex agent) を用いて、核酸又はトリプレックス物質によりmRNAを隠すか、又はリボザイムでこれを切断するかのいずれかにより、特異的mRNAの転写又は翻訳を阻害することができる。

【0021】

アンチセンス核酸は、特異的mRNA分子の少なくとも一部と相補的であるDNA又はRNA分子である(Weintraub, Sci. Am., 262:40(1990))。細胞において、アンチセンス核酸は、対応するmRNAにハイブリダズし、2本鎖分子を形成する。細胞は2本鎖mRNAを翻訳しないので、アンチセンス核酸はmRNAの翻訳を妨害する。約15個以上のヌクレオチドのアンチセンスオリゴマーが、容易に合成され、かつ恐らく標的細胞に組入れられた際により大きい分子よりも問題を引き起こすことが少ないので、好ましい。遺伝子のin vitro翻訳を阻害するためのアンチセンス法の使用は、当該技術分野において周知である(Marcus-Sakura, Anal. Biochem., 172:289(1988))。

【0022】

アンチセンス核酸は、アルツハイマー病において蓄積するアミロイド前駆体タンパク質のような変異タンパク質又はドミナントアクティブ遺伝子産物の発現をブロックするために使用することができる。このような方法は、更にハンチントン病、遺伝性パーキンソン病及び他の疾患の治療についても有用である。アンチセンス核酸は、毒性に関連したタンパク質の発現の阻害についても有用である。

【0023】

転写を停止するためのオリゴヌクレオチドの使用は、オリゴマーが二重らせんDNAの周りに巻きつき、3本鎖らせんを形成するトリプレックス戦略として公知のメカニズムによることができる。従って、トリプレックス化合物は、選択された遺伝子上の独自の部位を認識するように設計することができる(Maherら, Antisense REs and Dev., 1(3)227(1991); Helene, Anticancer Drug Dis., 6(6):569(1991))。

【0024】

リボザイムとは、他の1本鎖RNAをDNA制限エンドヌクレアーゼに類似の方法で特異的に切断する能力を有するRNA分子である。これらのRNAをコードしているヌクレオチド配列の修飾を通じて、RNA分子において特異的ヌクレオチド配列を認識し切断する分子を操作することが可能である(Cech, J. Amer. Med. Assn., 260:3030(1988))。このような方法の大きい利点は、特定の配列を有するmRNAのみが不活性化されることである。

【0025】

上体反応調節剤をコードしている核酸を導入することが望ましい。この範疇に含まれるのは、「インターロイキン」に分類される多くのサイトカイン類、例えばインターロイキン1から12をコードしている核酸を含む免疫賦活剤である。更にこの範疇に含まれるのは、必ずしも同じメカニズムに従って作用するものではないが、インターフェロン、特にγインターフェロン(γ-IFN)であり、腫瘍壊死因子(TNF)及び顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)である。このような核酸が骨髄細胞又はマクロファージに送達され、先天性の酵素欠損又は免疫不全を治療することが望ましい。増殖因子、毒素性ペプチド、リガンド、受容体又は他の生理学的に重要なタンパク質をコードしている核酸も、特異的非分裂細胞に組入れることができる。

【0026】

従って、本発明の組換えレンチウイルスは、抗HIV-分子によりHIV-感染細胞(例えばT細胞又はマクロファージ)を治療するために使用することができる。加えて、例えば、気道上皮を、嚢胞性繊維症の治療のために、嚢胞性繊維症トランスメンブランコンダクタンス調節(CFTR)遺伝子を有する本発明の組換えレンチウイルスにより感染することができる。

【0027】

本発明の方法は、更にex vivoでの本発明の組換えレンチウイルスに感染した細胞の移植、又は中枢神経系もしくは脳室洞(ventricular cavity)への又は宿主脳の表面の硬膜下へのin vivoでの感染に関連している、神経細胞、グリア細胞、繊維芽細胞又は間充細胞の移植(transplantation)又は「グラフト」に有用である。このようなグラフト化に関する方法は、当業者には周知であり、かつBjorklund及びStenevi編集のNeural Grafting in the Mammalian CNS(1985年)に記載されている。

【0028】

タンパク質産物の欠損に起因する疾患に関して、遺伝子導入は、代償療法のために正常遺伝子を感染組織へ組入れることができ、更にはアンチセンス変異を用いた疾患のための動物モデルを作製することができる。例えば、筋肉、脾臓又は

肝臓細胞の感染のためには、ファクターVIII又はIXをコードする核酸をレンチウイルスに挿入することが望ましい。

【0029】

プロモーター配列は、所望の遺伝子配列に対して同種又は異種であることができる。広範なプロモーター類を利用することができ、これはウイルス又は哺乳類のプロモーターを含む。細胞又は組織に特異的なプロモーターは、特異的細胞集団における遺伝子配列の発現の標的指向化に利用することができる。本発明に適した哺乳類又はウイルスプロモーターは、当該技術分野において入手することができる。

【0030】

任意に、クローニング段階の間に、パッケージングシグナル及び異種クローニング部位を有する導入ベクターと称される核酸構築物は、更に選択マーカー遺伝子を含む。マーカー遺伝子は、該ベクターの存在を調べるために利用され、その結果感染又は組込みが確認される。マーカー遺伝子の存在は、該挿入物を発現している宿主細胞のみの選択及び増殖を保証する。典型的な選択遺伝子は、抗生物質又は他の毒物、例えばヒスチジノール、プロマイシン、ハイグロマイシン、ネオマイシン、メトトレキサートなどに対する耐性を付与するタンパク質、及び細胞表面マーカーをコードしている。

【0031】

本発明の組換えウイルスは、哺乳類細胞に核酸配列を導入することが可能である。用語「核酸配列」は、本願明細書において詳細に論ぜられるように、いずれかの核酸分子、特にDNAを意味する。核酸分子は、DNA、cDNA、合成DNA、RNA又はそれらの組合せを含む様々な起源に由来することができる。このような核酸配列は、天然のイントロンを含むこともあり、含まないこともあるようなゲノムDNAを包含し得る。更にこのようなゲノムDNAは、プロモーター領域、ポリA配列又は他の関連する配列に関連して得ることができる。ゲノムDNAは、当該技術分野において周知の手段により、適当な細胞から抽出及び精製することができる。あるいは、メッセンジャーRNA(mRNA)は、細胞から単離し、逆転写又は他の手段によりcDNAを作製するために使用することができる。

【0032】

好ましくは、本発明の方法で作製された組換えレンチウイルスは、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の誘導体である。このenvはHIV以外のウイルスに由来するであろう。

本発明の方法は、いくつかの実施態様において、前述のように、例えばgag、pol、env、tat及びrevのような組換えビリオンのパッケージングに必要な全ての機能をもたらす3種のベクターを提供する。本願明細書において記したように、tatは、予想外の利点を機能的に欠失し得る。これらのベクターがパッケージング細胞株の形質転換及び作出に使用され、組換えレンチウイルスを生じる限りは、使用されるベクターの数に制約はない。

【0033】

前述のベクターは、トランスフェクション又は感染によりパッケージング細胞株に組入れられる。このパッケージング細胞株は、該ベクターゲノムを含むウイルス粒子を産生する。トランスフェクション又は感染の方法は、当業者には周知である。パッケージングベクター及び導入ベクターのパッケージング細胞株への同時トランスフェクション後、当業者によって用いられる常法により組換えウイルスは培養培地から回収され、かつ力価測定される。

【0034】

従って、このパッケージング構築物は、リン酸カルシウムトランスフェクション法、リポフェクション法又は電気穿孔法により、通常はneo、DHFR、Glnシンテターゼ又はADAのようなドミナントな選択マーカーと一緒に、ヒト細胞株に導入し、その後適当な薬物の存在下で選択しかつクローンを単離することができる。これらの選択マーカー遺伝子は、該構築物の中のパッケージング遺伝子に物理的に連結することができる。

【0035】

パッケージング機能が適当なパッケージング細胞によって発現されるように設計された安定した細胞株は公知である。例えばパッケージング細胞について開示した米国特許第5,686,279号；及びO'rayらの論文(Proc. Natl. Acad. Sci., 93:11400-11406(1996))を参照のこと。

前記Zuffereyらの論文は、HIV-1 env 遺伝子を含むpol の3' 側配列が欠失しているレンチウイルスパッケージングプラスミドを示している。この構築物は、tat 及びrev 配列を含み、かつ3' 側LTR はポリA配列で置換されている。5' 側LTR 及びpsi 配列は、誘導性であるもののような別のプロモーターによって置換されている。例えば、CMV プロモーター又はそれらの誘導体を使用することができる。

【0036】

問題のパッケージングベクターは、レンチウイルスタンパク質の発現を増強しかつ安全性を増強するために、パッケージング機能を更に変更することを含む。例えばgag の上流のHIV 配列は全て除去することができる。更にenv の下流の配列も除去することができる。更に、RNA のスプライシング及び翻訳を増強するために、ベクターを修飾する工程を行うことができる。

【0037】

複製コンピテントなレンチウイルスの作出の可能性がよりごくわずかであるベクターを提供するために、本発明は、転写機構によりウイルス発現を促進する調節タンパク質であるtat 配列が機能的に欠失されているようなレンチウイルスパッケージングプラスミドを提供する。その結果、tat 遺伝子が、一部又は全て欠失されるか、もしくは様々な点突然変異又は他の突然変異がtat 配列に生じ、遺伝子を非機能性にする。技術者は、tat 遺伝子を非機能性にする公知の技術を実践することができる。

【0038】

ベクターの構築並びに細胞のトランスフェクション及び感染に使用される技術は、当該技術分野において広範に実践されている。実施者は、特定の条件及び手順を説明する標準の手段材料を熟知している。しかし、便宜上下記の段落においてガイドラインを示す。

本発明のベクターの構築には、当該技術分野において周知の標準的連結及び制限法を用いる (Maniatisら、Molecular Cloning : A Laboratory Manual、コールドスプリングハーバー、NY、1982年を参照のこと)。単離されたプラスミド、DNA 配列又は合成されたオリゴヌクレオチドは、切断し、望ましい形状に適合さ

せかつ再連結する。

【0039】

位置特異的DNA切断は、当該技術分野において理解される条件下、及び特別な場合は市販の制限酵素の製造業者の指定する条件下で、適当な制限酵素（又は酵素類）で処理することによって行われ、これについては、例えばNew England Biolabs社の製品カタログを参照のこと。一般に、プラスミド又はDNA配列約1 μ gを、約20 μ lのバッファー液中で酵素1ユニットで切断する。典型的には、制限酵素の過剰量を用いて、DNA基質の完全な消化を確実にする。およそ37℃で約1～2時間のインキュベーション時間が実行可能であるが、その変形も許容することができる。各インキュベーション後、フェノール/クロロホルムを用いる抽出によりタンパク質を除去し、その後エーテルで抽出し、かつ核酸を水性画分からエタノール沈殿により回収する。所望であるならば、切断された断片のサイズ分離を、常法を用いポリアクリルアミドゲル又はアガロースゲル電気泳動により行うことができる。サイズ分離の一般的説明は、Method of Enzymology、65:499-560(1980)に見ることができる。

【0040】

制限切断された断片は、50mM Tris(pH7.6)、50mM NaCl、6mM MgCl₂、6mM DTT及び5～10 μ M dNTPの中で、20℃で約15～25分のインキュベーション時間を用いた、4種のデオキシヌクレオチド3リン酸(dNTP)の存在下における、E.coli DNAポリメラーゼIの巨大断片（クレノウ）による処理により平滑末端であり得る。クレノウ断片は、5'の粘着末端を満たすが、たとえ4種のdNTPが存在したとしても、突出している3'側の1本鎖を砕いてしまう(chew back)。所望であるならば、選択性の修復が、粘着末端の性質によって指示された制約内で、唯一のdNTPの、又は選択されたdNTPの供給によって行うことができる。クレノウによる処理後、この混合物はフェノール/クロロホルムで抽出され、エタノール沈殿される。適当な条件下でのS1ヌクレアーゼ又はBa1-31による処理は、いずれかの1本鎖部分の加水分解を生じる。

【0041】

連結は、下記の標準条件及び温度下で、容量15～50 μ lの中で行うことができ

る：20mM Tris-Cl pH7.5、10mM MgCl₂、10mM DTT、33mg/ml BSA、10mM-50mM NaCl、及び40 μ M ATP、0.01~0.02(Weiss)ユニットのT4 DNAリガーゼを用い0℃（「粘着末端」の連結）又は1mM ATP、0.3~0.6(Weiss)ユニットのT4 DNAリガーゼを用い14℃（「平滑末端」の連結）のいずれか。分子内「粘着末端」の連結は、通常総DNA濃度33~100 μ g/mlで行われる（総末端濃度5~100mM）。分子内平滑末端の連結は、（通常10~30倍のモル過剰量のリンカーを用いて）1 μ Mの総末端濃度で行われる。

【0042】

従って、本発明において、レンチウイルスパッケージングベクターは、プロモーター及び、gag、pol、rev、env又はそれらの組合せ、並びにtatの特異的機能の又は実際の削除を伴うような、当業者によって決定された他の任意又は必要な調節配列、及び任意に他のレンチウイルスアクセサリ遺伝子を含むように作出される。

【0043】

レンチウイルス導入ベクター（Naldiniら、前記；Proc. Natl. Acad. Sci., 93:11382-11388(1996)）は、in vitroにおいてヒト細胞を増殖抵抗性(growth-arrested)に感染するために、及び成体ラットの脳へ直接注射した後に神経を形質導入するために使用されている。このベクターは、in vivoにおける神経へのマーカー遺伝子導入時の効率がよく、かつ検出可能な病理が存在しない場合に長期間発現が達成される。これまで試験した中で最長である該ベクターの単回注射後10ヶ月間にわたって分析した動物は、導入遺伝子発現の平均レベルにおいて減少を示さず、かつ組織病理又は免疫反応の徴候を示さなかった（Blomerら、J. Virol., 71:6641-6649(1997)）。非分裂細胞を形質導入するベクターの能力を損なうことなく、HIVビルレンス遺伝子であるenv、vif、vpr、vpu及びnefが欠失されたレンチウイルスベクターの改善されたバージョンが開発されている。多様に減弱されたバージョンは、該ベクターの生体安全性の実質的改善を示している（Zuffereyら、前記）。

【0044】

形質導入された細胞においては、組込まれたレンチウイルスベクターは、一般

に各末端にLTRを有する。5'側LTRは、特にHIV-感染細胞において、組換えの基質となり得る「ウイルス性」転写物の蓄積を引き起こすことがある。3'側LTRは、細胞のプロトオンコジーンを活性化した結果生じる危険性を伴う下流の転写を促進する。

【0045】

U3配列は、HIV LTRの大部分を含む。このU3領域は、感染細胞における及び細胞活性化に反応したHIVゲノムの基本的かつ誘導された発現を変調するエンハンサーエレメント及びプロモーターエレメントを含む。プロモーターエレメントのいくつかは、ウイルス複製には必須である。エンハンサーエレメントの一部は、ウイルス単離体において高度に保存され、かつウイルス病原性の重大なビルレンス因子であることが示されている。エンハンサーエレメントは、ウイルスの様々な標的細胞において、複製率に影響を及ぼすように作用することができる (Mart has ら、J. Virol., 67:6047-6055(1993))。

【0046】

ウイルス転写は5'側LTRのU3領域の3'末端から始まるので、これらの配列は、ウイルスmRNAの一部ではなく、かつ3'側LTR由来のそれらのコピーは、組込まれたプロウイルスにおいて両LTR生成の鋳型として作用する。U3領域の3'コピーがレトロウイルスベクター構築物において変更される場合は、このベクターRNAは依然プロデューサー細胞の完全な5'側LTRから産生されるが、標的細胞において再生することはできない。このようなベクターの形質導入は、子孫ウイルスにおいて両LTRの不活性化を生じる。従ってレトロウイルスは、自己不活性(SIN)であり、かつこれらのベクターはSin導入ベクターとして公知である。

【0047】

しかしながら、3'側LTRの欠失の程度には制限がある。第一に、U3領域の5'末端は、組込みに必要である、ベクター導入における他の本質的機能を提供する(末端のジヌクレオチド+att配列)。従って末端ジヌクレオチド及びatt配列は、欠失されているU3配列の5'側境界を示すことができる。加えて、一部の曖昧に定義された領域は、R領域下流のポリアデニル化部位の活性に影響を及ぼすことができる。3'側LTRのU3配列の過剰な欠失は、プロデューサー細胞にお

けるベクターの力価及び標的細胞における導入遺伝子の発現の両方に対し、有害な結果を伴うベクター転写物のポリアデニル化を減少することができる。他方、限定された欠失は、形質導入された細胞においてLTRの転写活性を無効にすることはできない。

【0048】

本願明細書において説明したレンチウイルス導入ベクターの新規バージョンでは、3'側LTRのU3領域の増加する欠失を保持している(図1:U3LTRのヌクレオチド-418から指定された位置までのU3欠失の長さ:SIN-78、SIN-45、SIN-36及びSIN-18)。プロデューサー細胞におけるベクターの力価及び標的細胞における導入遺伝子の発現のいずれも損なうことなく、3'側LTRからのU3配列のほぼ完全な欠失を有するレンチウイルスベクターが開発された。最も広範な欠失(-418から-18)は、TATAボックスにまで及び、その結果形質導入された細胞のLTRの転写活性が無効になっている。従って、3'側の欠失に関するより低い限界は、TATAボックスを含む位置まで及ぶ。この欠失は、R領域までのU3領域の残りである。これは、ベクターの安全性が劇的に増すことを意味している。様々な欠失が当該技術分野において公知の実施法により作出された。

【0049】

驚くべきことに、導入遺伝子の平均の発現レベルは、より完全なベクターと比べて、SINベクターによって形質導入された細胞においてでさえ高かった。これは恐らく、内部プロモーター上の上流HIVLTRから転写の妨害が除かれたためであろう。このようなU3領域の広範囲の欠失を伴うSIN型ベクターは、形質導入効率を損なうことなく、マウス白血病ウイルス(MLV)を基にしたレトロウイルスベクターについて作出することはできない。

【0050】

導入ベクターの5'側LTRは、異種エンハンサー/プロモーターを伴うU3領域の転写調節エレメントの一部又は全部を置換することによって修飾された。この変更は、プロデューサー細胞における導入ベクターRNAの発現を増強するように; HIVのtat遺伝子不存在下でのベクターの作製を可能にするように; 並びに、前述のSINベクターを「救出」するための3'側が欠失したバージョンと再結合

することができる上流のHIV LTR の野生型コピーを除去するように作出された。

【0051】

従って、5' 側LTR に前述の変更を含むベクターである5' ベクターは、発現を増強する配列及びtat を発現しないパッケージング細胞との組合せのために、導入ベクターとしての使用を見出すことができる。

このような5' ベクターは、更に先に説明したように3' 側LTR に修飾を保持することもでき、単に発現が増強されず、tat を発現しないパッケージング細胞において使用することができるだけでなく、更に自己不活性化することができるような改善された導入ベクターを生じる。

【0052】

HIV LTR からの転写は、tat タンパク質のトランスアクチベーター機能に高度に依存している。プロデューサー細胞に存在するコアパッケージング構築物によってしばしば発現されるtat が存在する場合、HIV LTR からのベクターの転写は強力に刺激される。完全な長さの「ウイルス」RNA は、パッケージングシグナルの完全な相補性を有しているので、このRNA は効率的にベクター粒子中でキャプシド形成され、かつ標的細胞に導入される。プロデューサー細胞のパッケージングによって利用できるベクターRNA の量は、感染性ベクター作製の律速段階である。

【0053】

5' 側LTR のエンハンサー領域又はエンハンサー及びプロモーター領域は、各々、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) 又はマウスラウス肉腫ウイルス (RSV) のエンハンサー又はエンハンサー及びプロモーターにより置換された。該構築物の概略及びハイブリッドベクターのコード名については、図2を参照のこと。CCL 及びRRL ベクターは、5' 側U3領域が完全に置換されている。

【0054】

対照のレンチベクターHR2 及び5' 側ハイブリッドのパネルを、導入ベクターによりトランスフェクションされたプロデューサー細胞において、tat トランスアクチベーターを提供するパッケージング構築物の存在下又は不存在下で、比較した。4種のキメラベクターの転写レベルは、パッケージング構築物の存在下及

び不存在下の両方で、対照レンチベクターのそれよりも高い。全てのキメラベクターは、導入遺伝子を標的細胞に効率的に導入し、かつRRL ベクターは対照HR2ベクターと同様に作用する。最後に、ベクターの標的細胞への組込みを、形質導入後の初期及び後期継代時に形質導入された細胞を調べることにより確認した。そのベクターが組込まれたことを示す導入遺伝子陽性細胞の割合に減少は認められなかった。

【0055】

パッケージング構築物不存在下でプロデューサー細胞において得られた5'側LTRが修飾された導入ベクターRNAの高レベルの発現は、作製されるベクターが機能性tat遺伝子の不存在下で機能していることを示している。先に本願明細書において説明したパッケージングプラスミドについて示されたtat遺伝子の機能欠損は、tatタンパク質に関連した多くの病理活性が授けられたレンチウイルスベクターシステムに対するより高レベルの生体安全性をもたらすであろう。従って、生体安全性が顕著に改善されたレンチウイルスベクターは、5'末端又は3'末端のいずれにもHIV LTRの野生型コピーを有さないSIN導入ベクターであり、これは本願明細書において説明したtat-不含有パッケージングベクターと共同して使用される。

【0056】

ウイルス上清は、トランスフェクションの48時間後の上清のろ過のような常法を用いて回収される。ウイルスの力価は、例えば適量のウイルスの上清による、 10^6 個のNIH 3T3細胞又は 10^5 個のHeLa細胞の感染により、ポリブレン（シグマケミカル社、セントルイス、MO） $8\mu\text{g/ml}$ の存在下で測定される。48時間後、形質導入効率がアッセイされる。

【0057】

このように本発明は、高力価組換えウイルスを作製する方法及び手段を提供する。このようなウイルス粒子調製物を用いて、当該技術分野において公知の方法により標的細胞を感染することができる。従って本発明は、標的細胞が宿主から取り出され、公知の方法を行い培地において形質転換され、その後該宿主に戻されるような、ex vivo 遺伝子治療の用途における使用を見出すであろう。

【0058】

以下に記された本発明の詳細な説明は、本発明の様々な実施態様を示す限定を意図しない実施例である。

実施例 1

レンチウイルスパッケージングプラスミドの構築

レンチウイルスパッケージングプラスミドは、前記Zuffereyらの論文において先に記されたプラスミドpCMV Δ R8.9 (Δ Vpr Δ Vif Δ Vpu Δ Nef) に由来した。pCMV Δ R8.9のnef 遺伝子の残りの配列を、XhoI及びBstEIIによる消化により除去し、クレノウで満たし、かつ再連結した。この構築物の、100 塩基対を欠失し、HIV-1 の切断型env のリーディングフレームを、ゲノムインスリンのポリアデニル化部位に結合し、プラスミドpCMV Δ R8.73 を得た。

【0059】

本発明の別の実施態様において、プラスミドpCMV Δ R8.73 は、CMV プロモーターの下流のCMV 由来の配列の133 塩基対が欠失されている。この配列は、スプライスドナー部位を含み、かつこれはプラスミドpCMV Δ R8.73 のSacII による消化及びより大きい断片への再連結によって除去され、プラスミドpCMV Δ R8.74 が得られた。

【0060】

別の本発明の実施態様においては、gag 遺伝子の開始コドンの上流のプラスミドpCMV Δ R8.74 に残っているHIV-由来配列の、コンセンサス5' スプライスドナー部位以外の全てを除去した。同時に、gag 遺伝子上流の配列を、最適翻訳効率で変更し、プラスミドpCMV Δ R8.75 を得た。pCMV Δ R8.75 は、pCMV Δ R8.74 に由来し、94塩基対のSstII-ClaI断片を、以下から成るSstII-ClaIオリゴヌクレオチドリンカーで置き換えることによって得た：5' -GGGACTGGTGAGTGAATTCGAGATCTGCCCGCCCATGGGTGCGAGCGCTCAGTATTAAGCGGGGAGAATTAGAT-3' (配列番号：1) 及び5' -CGATCTAATTCTCCCCGCTTAATACTGACGCTCTCGACCCATGGCGCGGCAGATCTCGAATTCACCTACCACTCCCGC-3' (配列番号：2)。

【0061】

別の本発明の実施態様において、誘導可能なパッケージング構築物が、CMV プ

ロモーターを含むpCMV Δ R8.74 のPstI-SacII断片を、最小のCMV プロモーターに連結したテトラサイクリンオペレーター配列の7個のタンデムコピーと置き換えることにより得た。tet-調節されたパッケージングプラスミドpTet Δ R8.74 を得た。

実施例 2

レンチウイルス導入ベクターの構築

レンチウイルス導入ベクタープラスミドは、先にNaldini らの論文 (Sci., 272:263-267(1996)) に記されたプラスミドpHR'-CMV-LacZ に由来した。pHR2は、pHR'中の3' 側LTR の上流のnef 配列の124塩基対が、HIV1配列を減少しかつ導入遺伝子のクローニングが促進されるように両方のポリリンカーと置き換えられているような、レンチウイルス導入ベクターである。pHR2は、pHR'-CMV-LacZ に由来し、4.6kb ClaI-StuI 断片を、鋳型としてpHR'-CMV-LacZ を用いかつオリゴヌクレオチドとして下記を使用するPCR により作製された828塩基対のClaI-StuI 断片の、pHR'-CMV-LacZ 由来の4.4kb StuI-NcoI 断片及び4.5kb NcoI-ClaI 断片と3部位で連結したものと置き換えることによって得た：5' -CCATCGATCACGA GACTAGTCTACGTATCCCCGGGACGGGATCCGCGGAATTCGGTTTAAGAC-3' (配列番号：3) 及び5' -TTATAATGTCAAGGCCTCTC-3' (配列番号：4)。

【0062】

本発明の別の実施態様において、pHR3は、pHR2のRev 反応エレメント(RRE) の上流のenv コード配列の148塩基対(ATGを含む)が欠失しているようなレンチウイルスベクターである。pHR3はpHR2に由来し、pHR2の839塩基対NotI-SpeI 断片を、鋳型としてpHR2を用いかつオリゴヌクレオチドプライマーとして下記を使用するPCR により得られた747塩基対NotI-SpeI 断片と置き換えることによって得た：5' -GCGGCCGAGGAGCTTTGTCCTTGG-3' (配列番号：5) 及び5' -TACGT AGGACTAGTCTCG-3' (配列番号：6)。

【0063】

本発明の別の実施態様において、pHR5は、310塩基対gag コード配列(Gag タンパク質の15番目のアミノ酸の下流の全gag コード配列)がpHR2から欠失されているレンチウイルス導入ベクターである。pHR5は、pHR2のNruIによる消化、NotI

リンカー（合成オリゴヌクレオチド5'-TTGCGGCCGCAA-3'、（配列番号：7））の付加、310塩基対の断片を切り出すためのNotIによる消化、その後の再連結によって得た。

【0064】

本発明の別の実施態様において、pRH6は、パッケージすることが可能な完全な長さの転写物の産生を増強するために、5'側スプライスドナーシグナルが変異された（TGGTがTGATへ）レンチウイルスベクターである。pRH6はpHR5に由来し、239塩基対AflIII-ApoI断片を、鋳型としてpHR2を用いかつオリゴヌクレオチドプライマーとして下記を使用するPCRにより作製された239塩基対AflIII-ApoI断片によって置き換えることによって得た：5'-CCACTGCTTAAGCCT-3'（配列番号：8）及び5'-CAAAATTTTGGCGTACTCATCAGTCGCCGCCCTCG-3'（配列番号：9）。

【0065】

全てのPCR断片は、直接TAクローニングベクターpCR2.1（インビトロゲン社）へのPCR反応産物の最初のクローニング、それに続く配列の検証及び適当な酵素による切り出しにより作製した。

実施例3

5'側LTR キメラレンチウイルス導入ベクターの構築

本発明の別の実施態様において、レンチウイルスベクターの5'側LTRは、HIV-1のR領域に結合したラウス肉腫ウイルス(RSV)のU3領域由来のエンハンサー及びプロモーターを含む（プラスミドpRRL）。pRRLは、オリゴヌクレオチドリリンカーを用いて、RSVのエンハンサー及びプロモーター（転写開始位置に対してヌクレオチド-233から-1）がHIV-1のR領域に正確に融合されたようなレンチウイルス導入ベクターである。pRRLは、国際公開公報第97/07225号を参照し、プラスミドpRT43.RSV.F3及びpRH2に由来し、かつpRT43.RSV.F3の3.4kb EcoRI-HpaI断片を、pRH2の0.67kb BglIII-NotI断片及びpRH2の1.7kb NotI-StuI断片で、5'-AATTGCCGCATTGCAGAGATATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACAATAACGGGTCTCTCTGGTTAGACCA-3'（配列番号：10）及び5'-GATCTGGTCTAACCAGAGAGACCCGTTTATGTATCGAGCTAGGCACCTAAATACAATATCTCTGCAATCGGCC-3'（配列番号：11）のオリゴヌクレオチドからなる合成EcoRI-BglIIIオリゴヌクレオチドリリンカーにより置き換える

ことによって得た。

【0066】

本発明の別の実施態様において、レンチウイルスベクターの5'側LTRは、HIV-1のプロモーター領域（転写開始位置に対して-78塩基対の位置から）に結合したラウス肉腫ウイルス(RSV)のエンハンサー（転写開始位置に対してヌクレオチド-233から-50）を含む（プラスミドpRLL）。

pRLLは、RSVのエンハンサーがHIV-1のプロモーター領域にオリゴヌクレオチドリンカーを用いて融合されたレンチウイルス導入ベクターである。pRLLは、プラスミドpRT43.RSV.F3及びpHR2に由来し、かつpRT43.RSV.F3の3.4kb EcoRI-HpaI断片を、pHR2の0.724kb AlwNI-NotI断片及びpHR2の1.7kb NotI-StuI断片で、オリゴ5'-AATTGAGGCGCTGGCCTGGGCGGCACTGGGGAGTGGCGAGCCCTCAGATC-3'（配列番号：12）及びオリゴヌクレオチド5'-CTGAGGGCTCGCCACTCCCCAGTCCCCGCCAGGCCACGCCTCC-3'（配列番号：13）からなる合成EcoRI-AlwNIオリゴヌクレオチドリンカーにより置き換えることによって得た。

【0067】

本発明の別の実施態様（プラスミドpCCL）において、レンチウイルスベクターの5'側LTRは、HIV-1のR領域に結合した、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)の直前の初期(immediate early) エンハンサー及びプロモーター（Boshartらの発表した(Cell, 41:521-530(1985)) 転写開始位置に対してヌクレオチド-673から-1）を含む。pCCLは、プラスミドpRT43.2F3（米国特許第5,686,279号）及びpHR2に由来し、かつpRT43.2F3の3.8kb SstI-HpaI断片を、pHR2の1.7kb BglII-NotI断片及びpHR2の1.7kb NotI-StuI断片で、オリゴヌクレオチド5'-CGTTTAGTGAACCGGGTCTCTCTGTTAGACCA-3'（配列番号：14）及び5'-GATCTGGTCTAAC CAGAGAGACCCGGTTCCTAAACGAGCT-3'（配列番号：15）からなる合成SstI-BglIIオリゴヌクレオチドリンカーにより置き換えることによって得た。

【0068】

本発明の別の実施態様（プラスミドpCLL）において、レンチウイルスベクターの5'側LTRは、HIV-1のプロモーター領域（転写開始位置に対して-78塩基対位から）に結合したサイトメガロウイルス(CMV)の転写開始位置に対して-220か

ら-673のエンハンサーヌクレオチドを含む。pCLLは、プラスミドpRT43.2F3及びpRH2に由来し、かつpRT43.2F3の3.6kb NcoI-HpaI断片を、pRH2の0.724kb AlwNI-NotI断片及びpRH2の1.7kb NotI-StuI断片で、オリゴ5'-CATGGAGCGCTGGCCTGGCGGGACTGGGGAGTGGCGAGCCCTCAGATC-3' (配列番号: 16) 及び5'-CTGAGGGCTCGCCACTCCCCAGTCCCGCCCAGGCCACGCCTC-3' (配列番号: 17) からなる合成NcoI-AlwNIオリゴヌクレオチドリンカーにより置き換えることによって得た。

実施例 4

自己不活性化するレンチウイルスベクターの構築

pRRL.SIN-18 はpRRLに由来し、消化及び再連結により3' LRTにおける400塩基対EcoRV-PvuII断片が欠失された。

【0069】

pRRL.SIN-36 はpRRLに由来し、3'側LTRの493塩基対BbsI-AlwNI断片を、合成オリゴヌクレオチド5'-GATATGATCAGATC-3' (配列番号: 18) 及び5'-CTGATCA-3'並びにpRRL由来の0.54kb AlwNI-AvrII断片及び6.1kb AverII-BbsI断片との3部位の連結からなるオリゴヌクレオチドリンカーにより置き換えることによって得た。

【0070】

pRRL.SIN-45 はpRRLに由来し、3'側LTRの493塩基対BbsI-AlwNI断片を、合成オリゴヌクレオチド5'-GATATGATCAGAGCCCTCAGATC-3' (配列番号: 19) 及び5'-CTGAGGGCTCTGATCA-3' (配列番号: 20) 並びにpRRL由来の6.1kb AlwNI-AvrII断片及び6.1kb AverII-BbsI断片との3部位の連結からなるオリゴヌクレオチドリンカーにより置き換えることによって得た。

【0071】

pRRL.SIN-78 はpRRLに由来し、3'側LTRの493塩基対BbsI-AlwNI断片を、5'-GATATGATCAGAGGCGTGGCCTGGCGGGACTGGGAGTGGCGAGCCCTCAGATC-3' (配列番号: 21) 及びオリゴヌクレオチド5'-CTGAGGGCTCGCCACTCCCCAGTCCCGCCCAGGCCACGCCTCTGATCA-3' (配列番号: 22) 並びにpRRL由来の0.54kb AlwNI-AvrII断片及び6.1kb AverII-BbsI断片との3部位の連結からなるオリゴヌクレオチドリンカーにより置き換えることによって得た。

実施例5

安定したレンチウイルスパッケージング細胞00-28 の構築及びレンチウイルスベクターの安定した産物

293G細胞株を用いて、安定したレンチウイルスパッケージング細胞を作製した。293G細胞は、MDカセット (CMV プロモーター、並びにヒト β グロビン遺伝子由来の介入配列-エクソン2及び3、イントロン2-及びポリ(A) 部位) からのtet^R /VP16 トランスアクチベーター、並びに7個のテトラサイクリンオペレーター部位(tet⁰) の縦列反復配列に連結した最小のCMV プロモーター由来のVSV エンベロープを発現する。従って、VSV G の発現は、培養培地のテトラサイクリン濃度により調節され、この抗生物質が存在する場合には抑制される (Gossen及びBujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551(1992); Ory ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:11400-11406(1997))。293G細胞は、通常10%ドナーウシ血清を補充し、かつ1 μ g/mlテトラサイクリンを含有するDMEM/低濃度グルコース培養培地中で維持される。293G細胞の15cmプレートを、リポフェクタミン (GIBCO BRL) を用い、パッケージングプラスミドpCMV Δ R8.74 の13.36 μ g 及び選択プラスミドpZeoSV2 の1.33 μ g で、トランスフェクションした。この培地を24時間後に交換し、48時間後に細胞を、ゼオシン250 μ g/ml及びテトラサイクリン1 μ g/mlを含有する培地に分けた。3~4週間選択した後、250 クローンを採取し、96ウェルプレートに移し、かつこの培地を市販のキットを用いて、免疫捕獲によりHIV-1 p24 Gag 抗原についてスクリーニングした。52個のp24 陽性クローンを更なる分析のために増殖した。最良の5個のクローンが、12~23ng/ml のp24 値を有することが決定された。これらの5個のクローンのうち4個は、ウェスタンブロット分析により、テトラサイクリン除去後、VSV.G 発現について陽性であった。

【0072】

更に4個のp24/VSV.G 陽性クローンを、レンチウイルス導入ベクターをパッケージする能力について分析した。これらのクローンを、CMV プロモーターで起動されたA. Victoria のグリーン蛍光タンパク質(GFP) の発現カセットを含む一過性に産生されたレンチウイルスベクター (VSV.G 偽型) で、感染多重度10かつポ

リブレン (8 μ g/ml) 存在下で、感染した。次に感染したクローンを拡張し(expanded)、テトラサイクリンを除去した。誘導の72時間後、24時間培地の収集を行い、上清をろ過し、急速凍結した。凍結した上清を、GFP 遺伝子の形質導入について天然のHeLa細胞上で力価測定した。FACS分析により、パッケージングクローン00-28 の感染によって生じた細胞集団 (10-28 と称される) は、最大の力価 5×10^4 形質導入単位(T.U.)/ml を有することが決定された。

【0073】

感染されたパッケージング集団10-28 を、GFP レンチウイルスベクターの高力価産生クローンの作出に用いた。10-28 細胞は、FACSにより調べ、かつ最高のGFP 発現細胞を保持し拡張した。その後この集団を、一過性に作製されたGFP レンチウイルス (VSV.G 偽型) で更に4回、連続的に (「ピング(ping)」) 感染した。各々感染した後、上清をVSV.G 誘導の72~96時間後に収集した。上清を、HeLa細胞上で力価決定し、かつ免疫捕獲アッセイによりp24 含量について分析した。感染力価は、3回目のピング後にピークを示し、 1.5×10^6 T.U./mlに達した (図3参照)。3回目のピングからの細胞集団を、サブクローニングし、高力価ベクターのプロデューサーを単離した。

【0074】

本願明細書に引用した論文及び特許出願は全て、個々の論文又は特許出願が明確かつ個別に参照として組込まれることが示されるように、それらの全体が本願明細書に参照として組込まれている。

本発明に関連する当業者には明らかであるように、本発明は、先に明確に示されたものの以外の形、例えば、他の哺乳類細胞型のトランスフェクション及び形質導入も、本発明の精神又は本質的特長から逸脱することがない限りは包含している。従って前述の本発明の特定の実施態様は、例証のためであり制限するものではないとみなすべきである。本発明の範囲は、記したように、前述の説明において限定された実施例に制限されるものではなく、添付された特許請求の範囲である。

【図面の簡単な説明】

【図1】

これは様々なレンチウイルスベクターを示す。RSV はラウス肉腫ウイルスエンハンサー／プロモーターであり；RはLTR のR領域であり；U5はLTR のU5領域であり；SDはスプライスドナー部位であり、例えばHIV 5' 主要スプライスドナー部位であり； ϕ はプサイキャプシド形成シグナル配列であり；Gaはgag 遺伝子の一部であり；RRE はrev 反応性エレメントであり；SAはスプライスアクセプター配列であり；U3はLTR のU3領域である。

【図2】

これは、別のレンチウイルスベクターを示す。CMV はサイトメガロウイルスである。他の点では、記号は図1に示したものと同一である。

【図3】

これは、導入ベクターの量を漸増する場合の等級化されたベクター産生を示すグラフである。

【手続補正2】

【補正対象書類名】要約書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正内容】

【要約】

5' 側LTR 又は5' 及び3' 側LTR の両方で修飾されたレンチウイルスベクターは、組換えレンチウイルスベクターの作製に有用である。このようなベクターは、機能性tat 遺伝子の不存在下で作製することができる。この導入遺伝子を保持するベクターによる宿主細胞の複数の形質転換は、ウイルス産生を増強する。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US98/25719
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) : C12N 15/49, 15/86, 15/64 US CL : 435/320.1, 91.1, 91.4, 91.42, 325, 366, 369 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/320.1, 91.1, 91.4, 91.42, 325, 366, 369 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, Dialog, Medline, Biosis, Biotech Search terms: lentivirus, U3 region, LTR, transfer vector, packaging plasmid, HIV, enhancer		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NALDINI et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science, 12 April 1996, Vol. 272, pages 263-267, especially page 263.	1-18
A	NALDINI et al. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. Proceedings of the National Academy of Sciences, October 1996, Vol. 93, pages 11382-11388, especially page 11383.	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 JANUARY 1999.		Date of mailing of the international search report 10 MAR 1999
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized Officer DAVID GUZZO Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US98/25719

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BLOMER et al. Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. Journal of Virology. September 1997, Vol. 71, No. 9, pages 6641-6649, especially page 6642.	1-18
A	ELDER et al. Feline immunodeficiency virus as a model for development of molecular approaches to intervention strategies against lentivirus infections. Advances in Virus Research. Vol. 45, pages 225-247, especially pages 229-230.	1-18

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW

(72)発明者 ダル, トーマス

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94404,
フォスター シティ, レイクサイド ドライブ 342, セル ジェネシス, インコーポレイティド

(72)発明者 ファーソン, デボラー エー.

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94404,
フォスター シティ, レイクサイド ドライブ 342, セル ジェネシス, インコーポレイティド

(72)発明者 ウィット, ロシエル

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94404,
フォスター シティ, レイクサイド ドライブ 342, セル ジェネシス, インコーポレイティド

Fターム(参考) 4B024 DA02 EA04 FA02 FA06 HA12